


SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
LVX
FIAT
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS





Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Berlin, **P. Ehrlich**-Frankfurt a. M., **F. Hofmeister**-Straßburg i. E., **C. von Noorden**-Wien, **E. Salkowski**-Berlin, **N. Zuntz**-Berlin

unter Mitwirkung von

L. Asher-Bern, **J. Bang**-Lund, **G. Bertrand**-Paris, **A. Bickel**-Berlin, **F. Blumenthal**-Berlin, **Chr. Bohr**-Kopenhagen, **A. Bonanni**-Rom, **F. Bottazzi**-Neapel, **G. Bredig**-Heidelberg, **A. Durig**-Wien, **F. Ehrlich**-Berlin, **G. Embden**-Frankfurt a. Main, **S. Flexner**-New York, **S. Fränkel**-Wien, **E. Freund**-Wien, **U. Friedemann**-Berlin, **E. Friedmann**-Berlin, **O. v. Fürth**-Wien, **G. Galeotti**-Neapel, **H. J. Hamburger**-Groningen, **A. Heffter**-Berlin, **V. Henri**-Paris, **W. Heubner**-Göttingen, **R. Höber**-Kiel, **M. Jacoby**-Berlin, **R. Kobert**-Rostock, **M. Kumagawa**-Tokio, **F. Landolf**-Buenos-Aires, **L. Langstein**-Berlin, **P. A. Levene**-New York, **L. von Liebermann**-Budapest, **J. Loeb**-Berkeley, **W. Loeb**-Berlin, **A. Loewy**-Berlin, **A. Magnus-Levy**-Berlin, **J. A. Mandel**-New York, **L. Marchlewski**-Krakau, **P. Mayer**-Karlsbad, **L. Michaelis**-Berlin, **J. Morgenroth**-Berlin, **W. Nernst**-Berlin, **W. Ostwald**-Leipzig, **W. Palladin**-St. Petersburg, **W. Pauli**-Wien, **R. Pfeiffer**-Königsberg, **E. P. Pick**-Wien, **J. Pohl**-Prag, **Ch. Porcher**-Lyon, **F. Roehmann**-Breslau, **P. Rona**-Berlin, **S. Salaskin**-St. Petersburg, **N. Sieber**-St. Petersburg, **M. Siegfried**-Leipzig, **Zd. H. Skraup**-Wien, **S. P. L. Sörensen**-Kopenhagen, **K. Spiro**-Straßburg, **E. H. Starling**-London, **F. Tangl**-Budapest, **H. v. Tappeiner**-München, **H. Thoms**-Berlin, **J. Traube**-Charlottenburg, **A. J. J. Vandevelde**-Gent, **A. Wohl**-Danzig, **J. Wohlgemuth**-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Zwanzigster Band.

Mit 1 Tafel.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1909.

Druck von Oscar Brandstetter, Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Über sogenannte künstliche Komplemente.

Von

E. von Knaffl-Lenz (Graz).

(Arbeit aus dem Institut Pasteur zu Paris, Lab. Dr. Levaditi.)

(Eingegangen am 26. Juni 1909.)

v. Liebermann[1]) und Noguchi[2]) haben unabhängig voneinander ungefähr gleichzeitig Versuche veröffentlicht, die dafür sprechen sollen, daß die Komplemente Verbindungen von Seifen und Eiweißkörpern seien. Noguchi erbrachte den Nachweis, daß die hämolytischen Stoffe der Organextrakte Seifen sind, was bereits früher von Sachs und Kyes[3]), ferner von Levaditi[4]) und auch von Landsteiner vermutet wurde. Er stellte ferner fest, daß das hämolytische Vermögen der Seife parallel mit ihrer Löslichkeit läuft. v. Liebermann hingegen fand, daß Immunsera ihre hämolytische Wirksamkeit beim Filtrieren durch schwedisches Filtrierpapier verlieren, daß aber ein auf diesem Wege inaktiviertes Serum durch Vereinigung mit dem fast unsichtbaren Filterrückstand wieder reaktiviert werden könne. Die chemische Analyse des Filterrückstandes, der bei durch Hitze inaktivierten Seren bedeutend größer war, ergab höhere Fettsäuren und Calcium.

Beide Autoren zeigten nun, daß das hämolytische Vermögen der aus Serum oder Organextrakten gewonnenen Seifen durch Zusatz von Serum gehemmt werde. v. Liebermann erblickte nun in dieser durch die Serumproteine hervorgerufenen Hemmung die Ursache, daß die im Serum in einer Konzentration von ungefähr 0,1 °/₀₀ enthaltenen Seifen im normalen Blute keine

1) v. Liebermann, diese Zeitschr. 4, 25, 1907.

2) Noguchi, diese Zeitschr. 6, 327, 1907.

3) Sachs und Kyes, Berl. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 2 bis 4.

4) Levaditi, Annales de l'Inst. Pasteur 1903, 189.

Hämolyse hervorrufen. Der Immunkörper soll nun die Fähigkeit haben, diese gebundenen Seifen in Freiheit zu setzen und dadurch Hämolyse zu bedingen.

Weitere Analogien zwischen Seifen und Komplementen wurden von Noguchi unter anderem darin erblickt, daß sensibilisierte Blutkörperchen von einem Gemische von Seifen mit i. a. Meerschweinchenserum hämolysiert werden, während normale Erythrocyten ungelöst bleiben; ferner darin, daß solche Serumseifengemische durch längeres Lagern oder durch halbstündiges Erhitzen auf 56° inaktiviert werden.

Der von beiden Autoren ausgesprochenen Ansicht, daß die natürlichen Komplemente Verbindungen zwischen Seifen und Eiweißkörpern oder solchen Seifeneiweißverbindungen ähnlichen Körpern seien, wurde zuerst von Hecker[1]) widersprochen, der zeigte, daß sensibilisierte Blutkörperchen nach vollständiger Entfernung des Serums durch Seifen unter gewissen Bedingungen schwerer hämolysiert werden als normale, was gegen die Komplementnatur der Seifen sprechen würde. Diese Befunde wurden von v. Dungern und Coca[2]) und schließlich von v. Liebermann und Fenyvessy[3]) bestätigt. Ferner gelang es Friedemann und F. Sachs[4]) in keinem Falle, ein noch gerade wirksames Serum-Seifengemenge durch halbstündiges Erwärmen auf 56° zu inaktivieren, Befunde, die durch die vorliegende Arbeit vollinhaltlich bestätigt werden.

Diese sich widersprechenden Ergebnisse dürften wohl daher rühren, daß Noguchi die Sera, die er zur Herstellung seiner Serumseifenkomplemente benutzte, nur auf 51°, in einem Falle sogar nur auf 50°, während einer halben Stunde erhitzte, wodurch die Komplemente nicht vollständig zerstört wurden. Darauf haben bereits v. Dungern und Coca (l. c.) und Friedemann und Sachs (l. c.) hingewiesen. Die serumisierten Seifen jedoch, die sicher noch geringe Mengen von natürlichem Komplement enthielten, inaktivierte Noguchi stets bei 56° durch eine

[1]) Hecker, Arbeiten aus dem kgl. Inst. f. exp. Therapie 1907, Heft 3.

[2]) v. Dungern und Coca, Berl. klin. Wochenschr. 1908, 348.

[3]) v. Liebermann und Fenyvessy, Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 27.

[4]) Friedemann und Sachs, diese Zeitschr. 12, 1908.

halbe Stunde, wodurch die Reste des natürlichen Komplements gänzlich zerstört wurden. Da die hämolytische Wirkung der geringen Seifenmengen durch die Anwesenheit des Serums vollständig gehemmt war, erhielt er mit diesen komplementfreien Seren natürlich keine Hämolyse mehr.

Aus den zahlreichen Versuchen der vorliegenden Arbeit geht nun klar hervor, daß die hämolytische Wirkung der ölsauren und gallensauren Salze durch Serum abgeschwächt oder aufgehoben und verlangsamt wird, daß aber die Hämolyse quantitativ ebenso stark verläuft, gleichgültig ob man zu den obgenannten Substanzen i. a. Normal- oder i. a. Immunserum zusetzt. Sensibilisierte Blutkörperchen hämolysieren mit Immunserum schneller als mit Normalserum.

Durch Erhitzen der Serumseifengemische auf 56° während einer Stunde tritt nur eine bedeutende Verlangsamung und nur in den allerstärksten Verdünnungen eine geringe Abschwächung der Hämolyse auf und zwar bei Immunserum stärker als bei Normalserum.

Die betreffenden Gemische von Solanin oder Sapotoxin wirkten den Serumseifen analog, erlitten aber durch Erwärmung auf 56° keinerlei Veränderung.

Es handelt sich also bei allen diesen Versuchen nie um eine Aktivierung eines Immunserums durch Seifen, sondern die Hämolyse wird nur durch die zugesetzten Hämolytica hervorgerufen, deren Wirkung durch Normalserum ebenso stark gehemmt wird als durch Immunserum. Wenn der zeitliche Verlauf der Hämolyse nicht genau beobachtet wird, so kann eine Aktivierung des Immunserums insofern vorgetäuscht werden, als das Immunserumseifengemisch schneller hämolysiert als das betreffende Normalserumseifengemisch. Es ist leicht verständlich, daß Blutkörperchen, deren Oberfläche durch die Absorption des Immunkörpers verändert ist, für lipoidlösende Substanzen leichter durchgängig werden können, was den schnelleren Eintritt der Hämolyse durch Immunserumseifengemenge erklären würde.

Es besteht demnach zwischen den natürlichen Komplementen und serumisierten Seifen in den wichtigsten Punkten, d. i. ein Immunserum aktivieren zu können und sich durch Erwärmen auf 56° inaktivieren zu lassen, ein großer Unter-

schied, so daß Komplement und serumisierte Seifen wohl nicht als identisch betrachtet werden können.

Experimenteller Teil.

Es ist leider notwendig, eine größere Anzahl von den vielen Versuchen in Tabellenform vollständig wiederzugeben, um zu zeigen, daß zwischen der hämolytischen Wirkung der normalen und spezifischen Seifensera tatsächlich kein quantitativer, sondern nur ein zeitlicher Unterschied besteht.

Die Versuche wurden mit einer 5%igen Aufschwemmung 3 mal gewaschener Hammelblutköperchen (1 ccm) mit normalem und spezifischem Kaninchenserum gemacht, das durch 45 Minuten bei 56° inaktiviert worden war. 0,1 ccm des Immunserums waren imstande, in 35 facher Verdünnung bei einem Gesamtvolumen von 2,5 ccm einen Kubikzentimeter gewaschener Blutkörperchen komplett zu lösen. Bei sämtlichen Versuchen wurde das Volumen durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung auf 2,5 ccm ergänzt.

Vergleich der hämolytischen Wirkung von i. a. Normalserum plus ölsaurem Natrium auf sensibilisierte und auf normale Blutkörperchen.

Zu diesem Zwecke wurden 3 mal gewaschene Hammelblutkörperchen, die 1 ccm Blut entsprachen, mit 1 ccm i. a. Immunserum eine Stunde bei 37° digeriert, hierauf zentrifugiert und 2 mal gewaschen. Die Blutkörperchen waren ziemlich stark agglutiniert, das erste Waschwasser zeigte schwache Rotfärbung. Von diesen und von normalen Blutkörperchen wurde eine 5%ige Aufschwemmung gemacht und die hämolytische Wirkung einer $^n/_{100}$-Natriumoleatlösung vergleichsweise geprüft:

1 ccm Blutkörp. Gesamtvol. 2,5 ccm.

ccm Natriumoleat:	0,1	0,05	0,025	0,0125	
Komplette Hämolyse nach	5′	9′	25′	80′	sens. Blutk.
	5′	10′	35′	130′	norm. „

Da die Vergleichung der Hämolyse durch die starke Agglutination der sensibilisierten Blutkörperchen sehr erschwert war, wurde derselbe Versuch mit Blutkörperchen, die bei Zimmertemperatur durch 3 Stunden mit 10 ccm 10fach verdünnten Serums sensibilisiert worden waren, wiederholt. Dieselben waren wenig agglutiniert, das Waschwasser zeigte keine Rotfärbung. Mit 0,1 ccm normalem Meerschweinchenserum trat nach 10 Minuten komplette Hämolyse auf.

$^n/_{1000}$-Natriumoleatlösung.

ccm Natriumoleat:	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	
Komplette Hämolyse nach	20′	25′	35′	160′	keine	sens. Blutk.
	30′	35′	70′	250′	Hämolyse	norm. Blutk.

Noguchi verwendete für seine Versuche nicht reine Oleatlösungen, sondern sogenannte serumisierte Seifen. Es wurde daher in den folgenden

Versuchen zu den Oleatlösungen je 0,2 ccm eines 10fach verdünnten normalen i. a. Kaninchenserums zugesetzt. Ein Teil der Mischungen wurde bei Zimmertemperatur, ein anderer bei 56° vor dem Blutkörperchenzusatz 2 Stunden stehen gelassen.

$^n/_{1000}$-Natriumoleat.

Serum + ccm Natriumoleat:		0,1	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4		
		Komplette Hämolyse nach							
nicht	15′	20′	35′	45′	65′	90′	sens.		Blutkörp.
erhitzt	40′	55′	65′	90′	105′	145′	norm.		„
erhitzt	20′	35′	45′	60′	100′	150′	fast sens.		„
	40′	50′	65′	95′	105′	150′	kompl. norm.		„

Aus diesen Versuchen geht klar hervor, daß sowohl reine Oleatlösungen als auch serumisierte Seifen auf sensibilisierte Blutkörperchen ebenso stark hämolytisch wirken wie auf normale, und daß nur ein Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit besteht. Dieser Unterschied wird durch Erhitzen auf 56° bedeutend geringer, es tritt jedoch keine Inaktivierung ein. Es verhalten sich also serumisierte Seifen keineswegs wie Komplemente.

Einwirkung von i. a. I.-S. und von i. a. N.-S. auf mit Natriumoleat sensibilisierte Blutkörperchen.

Es wurden 10 ccm einer 5%igen Aufschwemmung gewaschener Hammelblutkörperchen mit 2 ccm einer $^n/_{1000}$-Natriumoleatlösung in einem Gesamtvolumen von 20 ccm 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, hierauf zentrifugiert und zweimal gewaschen. Auf so vorbehandelte Blutkörperchen wurde die Einwirkung von i. a. Normal-, i. a. Immunserum und physiologischer Kochsalzlösung untersucht. Die Sera wurden auf das Fünffache verdünnt.

i. a. N.-S.	Blutkörp. sens.	Blutkörp. norm.	NaCl-Lös.	Hämolyse
0,2	1 ccm	0	1,3 ccm	n. 2 St. (37°) starke H.; n. 12 St. (6°) kompl. H.
0,2	0	1 ccm	1,3 „	„ „ „ „ keine „ „ „ „ „ keine „
0	0	1 „	1,5 „	„ „ „ „ „ „ „ „ „ „ „ „

i. a. I.-S.	Blutkörp. sens.	Blutkörp. norm.	NaCl-Lös.	Hämolyse
0,2	1 ccm	0	1,3 ccm	n. 2 St. (37°) starke H.; n. 12 St. (6°) kompl. H.
0	1 „	0	1,5 „	„ „ „ „ mäßige „ „ „ „ „ „ „
0,2	0	1 ccm	1,3 „	„ „ „ „ keine „ „ „ „ „ keine „

Wie man aus diesen Versuchen sieht, wirkt Immunserum auf Blutkörperchen, die mit Seifen beladen sind, ebenso stark ein wie Normalserum. Auch physiologische Kochsalzlösung bewirkt bei 37° eine deutliche Hämolyse. Es wäre dies folgendermaßen zu erklären. Aus den Untersuchungen über Cytolyse des Seeigeleies[1]) geht hervor, daß die Protoplasmalipoide das Protoplasmaeiweiß vor der Wasseraufnahme aus der Suspensionsflüssigkeit und der dadurch bedingten Quellung oder Lösung schützen. Sobald aber die Lipoide auf chemischem oder physikalischem Wege gelöst oder verflüssigt werden, kann das Protoplasmaeiweiß Wasser aufnehmen, wodurch es entweder quillt oder sich löst. Höchstwahrscheinlich ist der Mechanismus der Hämolyse identisch mit dem der Cytolyse des Eies. Da der Erstarrungspunkt einer Lösung niedriger ist als der des reinen Lösungsmittels, muß der Schmelzpunkt der Blutkörperchenlipoide, die Seifen gelöst enthalten, ebenfalls niedriger werden. Es tritt nun in unserem Versuche bei den bei Zimmertemperatur sensibilisierten Blutkörperchen bei 37° bereits diese Verflüssigung auf, wodurch die Lösung des Hämoglobins durch die umgebende Flüssigkeit ermöglicht wird.

Vergleich der Wirkung zwischen ölsaurem Natrium + i. a. Immunserum einerseits und i. a. Normalserum andererseits.

Sind Seifen oder denselben chemisch verwandte Körper identisch mit Komplementen, so müßte ein i. a. Immunserum durch Zusatz von gerade noch hämolytischen Mengen ölsauren Natriums bedeutend stärker hämolysieren als ein entsprechendes Normalserum. Dies ist jedoch nicht der Fall. Beide hämolysieren gleich stark. Auch hier besteht wiederum nur ein Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit. Frisch bereitete serumisierte Seifen hämolysieren ebenso stark, aber schneller als solche, die einige Stunden bei Zimmertemperatur gestanden haben.

---

[1]) v. Knaffl-Lenz, Über die Beziehungen zwischen Lipoidverflüssigung und Cytolyse. Pflügers Archiv 123, 1908.

Die folgenden Tabellen mögen dies veranschaulichen.

$^{n}/_{1000}$-Natriumoleatlösung.

Blutkörperchen gleich zugesetzt.

ccm Natriumoleatlösung:		1,4	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4
Komplette Hämolyse nach	0,02 I.-S. +	15′	40′	35′	45′	50′	70′	90′	110′
	0,02 N.-S.	20′	40′	40′	60′	70′	90′	115′	130′

Blutkörperchen nach 3 Stunden zugesetzt.

ccm Natriumoleatlösung:		1,4	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4
Komplette Hämolyse nach	0,02 I.-S. +	30′	50′	50′	65′	75′	75′	110′	140′
	0,02 N,-S.	30′	50′	55′	80′	90′	95′	140′	160′

Inaktivierungsversuche.

Die Befunde Noguchis, ein durch Seifen aktiviertes Immunserum durch Erwärmen auf 56° unwirksam zu machen, konnten in keinem einzigen Falle bestätigt werden. Es trat wohl durch Erhitzen auf 56° während 1 Stunde eine bedeutende Verlangsamung, doch nur in den allerstärksten Seifenverdünnungen eine ganz geringe Abschwächung der Hämolyse auf; i. a. Normalsera verhielten sich jedoch fast ganz gleich, mit dem Unterschiede, daß die Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit und die Abschwächung eine geringere war.

Es scheint daher, daß durch diese Erwärmung nur der Immunkörper geschädigt wird, der den schnelleren Eintritt der Seifen in die Blutkörperchen ermöglicht, weswegen bei serumisierten Seifen, die auf 56° erwärmt werden, die Hämolyse ungefähr gleich schnell eintritt, gleichgültig, ob man hierzu Normal- oder Immunserum verwandte.

Die folgende Tabelle gibt einen Versuch wieder, bei dem die Serum-Seifengemenge 3 Stunden bei Zimmertemperatur vor dem Blutkörperchenzusatz gestanden hatten. Der eine Teil der Gemenge wurde außerdem 80 Minuten auf 56° erhitzt.

$^n/_{400}$-Natriumoleatlösung.

Natrium-oleatlösung ccm	+ 0,1 ccm i. a. N.-S.		+ 0,1 ccm i. a. I.-S.	
	erhitzt	nicht erhitzt	erhitzt	nicht erhitzt
	Hämolyse nach			
1,0	60′ kompl.	35′ kompl.	65′ kompl.	20′ kompl.
0,9	100′ „	40′ „	95′ „	30′ „
0,8	105′ „	50′ „	105′ „	40′ „
0,7	135′ „	55′ „	125′ „	50′ „
0,6	165′ „	60′ „	155′ „	55′ „
0,5	180′ „	110′ „	180′ „	75′ „
0,4	180′ mäßig	170′ „	180′ mäßig	75′ „
0,35	200′ „	200′ f. kompl.	200′ Spur	150′ f. kompl.
0,3	200′ Spur	200′ „ „	nach 200′ keine Hämolyse	170′ „ „
0,25	200′ Spürch.	200′ mäßig		200′ mäßig
0,2	200′ „	200′ „		200′ Spur
0,15	200′ „	200′ Spürch.		200′ Spürch.
0,1	200′ keine	200′ „		200′ „

Versuche mit gallensauren Salzen und Saponinsubstanzen.

Die gallensauren Salze verhalten sich den Seifen sehr ähnlich. Auch sie hämolysieren mit Immunserum schneller, wie folgender Versuch mit Natriumtaurocholat zeigt.

$^n/_{100}$-Natriumtaurocholatlösung (0,54 %).

ccm Na-Taur.:	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	
+ 0,1 ccm N.-S.	n. 65′	75′	95′	130′	155′	komplette Hämolyse
+ 0,1 ccm I.-S.	n. 30′	35′	35′	100′	180′	

0,5 ccm Taurocholatlösung hämolysierte weder mit Normal- noch mit Immunserum.

Dagegen lassen sich die gallensauren Salze + Serum durch einstündiges Erwärmen auf 56° teilweise inaktivieren. Auch hier tritt beim Immunserum eine stärkere Abschwächung auf als beim Normalserum. Da die Gallensäuren leicht zersetzlich sind — taurocholsaures Natrium wird durch siedendes Wasser bereits in seine Komponenten zerlegt — so dürfte die Abschwächung nach der Erwärmung wohl auf einer Hydrolyse beruhen.

Der folgende Versuch wurde mit einer $^n/_{200}$-Lösung (0,487 %) von glykocholsaurem Natrium angestellt. Der eine Teil der Serummischungen durch 1 Stunde auf 56° erwärmt.

ccm Na-Glykoch.:		1,2	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7
+ 0,01 N.-S.	nicht erhitzt	k. H.	k. Häm.	k. Häm.	Spur	Spürchen	0
	erhitzt	f. k. H.	mäßige H.	Spur	Spürchen	0	0
+ 0,01 I.-S.	nicht erhitzt	k. H.	k. Häm.	f. k. Häm.	Spur	0	0
	erhitzt	k. H.	Spur	Spürchen	0	0	0

Glykocholsaures Natrium erlitt durch Erwärmung eine noch stärkere Abschwächung.

Die analogen Gemenge von Sapotoxin und Solanin verhielten sich ebenso wie die Seifen, doch trat bei Erhitzen auf 56° während 1 Stunde keinerlei Verlangsamung oder Abschwächung der Hämolyse ein.

Die mit diesen Substanzen sensibilisierten Blutkörperchen hämolysierten mit Immunserum ebenso stark und schnell als mit Normalserum.

Schlußfolgerungen.

1. Die Hämolyse, hervorgerufen durch Ölsäure oder gallensaure Salze oder durch Saponinsubstanzen, wird sowohl durch Normal- als auch durch Immunserum gleich stark gehemmt. Es besteht nur ein Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit.

2. Durch Erhitzen der hämolytischen Gemenge auf 56° tritt nur eine äußerst geringe Abschwächung der Hämolyse in den höchsten Verdünnungen, jedoch eine bedeutende Verlangsamung derselben ein. Durch Erhitzen verliert das Immunserum in den höchsten Verdünnungen an Wirksamkeit.

3. Mit spezifischem Serum sensibilisierte Blutkörperchen hämolysieren mit Seifen schneller aber gleich stark wie normale.

4. Gemische von Serum mit Solanin oder Sapotoxin verhalten sich fast ebenso wie die betreffenden Seifengemenge, mit dem Unterschiede, daß durch Erwärmen auf 56° weder eine Abschwächung noch eine Verlangsamung der Hämolyse eintritt.

5. Die ölsauren und gallensauren Salze verhalten sich demnach in den wichtigsten Punkten verschieden von den Komplementen und können daher nicht als identisch mit denselben betrachtet werden.

Vermag der Hund Cellulose oder Rohfaser zu verdauen?

Von

Arthur Scheunert und Ernst Lötsch.

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule zu Dresden.)

(Eingegangen am 19. Juni 1909.)

Auf Grund der Untersuchungen von v. Knieriem[1]) hat man bisher immer angenommen, daß Hunde, also Carnivoren, das als „Rohfaser" bezeichnete Gemisch von schwer löslichen Zellwandbestandteilen nicht zu verdauen vermögen. Die Fähigkeit, diese Stoffe in ihrem Darmkanale in Lösung zu bringen, wurde deshalb lediglich als eine Eigenschaft der Herbi- und Omnivoren betrachtet. Erst in neuester Zeit ist dem widersprochen und auch eine Celluloseverdauung beim Hund angenommen worden.

Da Henneberg und Stohmann[2]) und später andere Autoren, z. B. v. Knieriem, es durch Versuche an Wiederkäuern und anderen Tieren wahrscheinlich gemacht hatten, daß der Anteil der „Rohfaser", die im Verdauungskanale verschwindet, die Zusammensetzung der Cellulose $C_6H_{10}O_5$ hatte, sprach und spricht man ganz allgemein von „Celluloseverdauung" auch dann, wenn es sich streng genommen nur um eine Rohfaserverdauung handelt.

Es ist nicht zu bestreiten, daß durch diese Identifizierung der Größe der Rohfaserverdauung mit der der Celluloseverdauung eine Unsicherheit bei der Beurteilung dieser Fragen der Verdauungslehre schon deshalb Platz greifen muß, weil das, was

---

[1]) v. Knieriem, Über die Verwertung der Cellulose im tierischen Organismus. Zeitschr. f. Biol. 21, 67, 1885.

[2]) Henneberg u. Stohmann, Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer. Braunschweig 1860/64.

man als „Rohfaser" analytisch bestimmt, ein je nach der Zusammensetzung des Ausgangsmaterials und der verwendeten analytischen Methode verschiedenartig zusammengesetztes Gemisch ist. Da bekannt ist, daß in diesem z. B. auch Pentosane vorhanden sind, über deren Verdaulichkeit keine Zweifel mehr bestehen, so erhellt, daß streng genommen Rohfaserverdauung und Celluloseverdauung nicht identifiziert werden können. Natürlich kann schon im Hinblick auf die erwähnten Resultate von Henneberg und Stohmann, v. Knieriem u. a. nicht geleugnet werden, daß die Rohfaserverdauung im allgemeinen einen genügenden Überblick über die Größe der Celluloseverdauung geben kann.

Daß man, nachdem seit diesen Untersuchungen bald 30 Jahre verstrichen sind, immer noch auf dem durch sie ermittelten und, wie soeben dargetan, nicht völlig einwandfreien Standpunkt angewiesen ist, hat seinen Grund darin, daß es bisher noch nicht gelungen ist, eine einwandfreie Methode der quantitativen Cellulosebestimmung auszuarbeiten.

Zwar sind viele Versuche in dieser Richtung unternommen worden, keiner aber war mit Erfolg gekrönt. Es liegt das daran, daß die Reindarstellung der Cellulose mit den größten Schwierigkeiten verknüpft ist, da sie alle jene Eigenschaften vermissen läßt, deren man sich bedienen könnte, um sie in reiner Form quantitativ abzuscheiden. Sie ist in dieser Hinsicht mit gewissen Angehörigen der Albuminoidgruppe — wir denken an die Keratine — zu vergleichen. Um aus einem Gemische zahlreicher Stoffe, wie es die cellulosehaltigen Pflanzenteile darstellen, die Cellulose abzuscheiden, verfährt man bei den bis jetzt bekannten analytischen Methoden derart, daß man alle anderen Stoffe zerstört und so die Cellulose von ihnen befreit. Da stets sehr energische Mittel angewendet werden müssen, um diese Zerstörung zu erzielen, kann eine solche Methode nur dann als für quantitative Zwecke brauchbar gelten, wenn der Beweis erbracht wird, daß nicht auch die Cellulose teilweise angegriffen wird, also Substanzverluste erleidet.

Im Jahre 1904 haben Simon und Lohrisch[1]), im Be-

---

[1]) O. Simon u. H. Lohrisch, Eine neue Methode der quantitativen Cellulosebestimmung in Nahrungsmitteln und Faeces. Zeitschr. f. phys. Chem. 42, 55, 1904.

streben, eine neue und brauchbare Methode der quantitativen Cellulosebestimmung zu schaffen, ein Verfahren ausgearbeitet, welches auf dem Verhalten der Cellulose gegen konzentrierte Kalilauge beruht.

Hoppe-Seyler[1]) hatte bei seinen bekannten Untersuchungen über die Bildung von Huminsubstanzen beobachtet, daß Cellulose, mit 50%iger KOH erhitzt, erst bei Temperaturen, die höher als 200° liegen, eine Zersetzung unter Aufschäumen erleidet. Auf Grund dieser Beobachtungen hatte dann Lange[2]) im Hoppe-Seylerschen Laboratorium eine Methode der quantitativen Cellulosebestimmung ausgearbeitet. Diese Methode haben Simon und Lohrisch verändert und wesentlich vereinfacht, indem sie für die Zerstörung der Nichtcellulose H_2O_2 anwenden und die Neutralisation vermeiden. Zur Fällung etwa in Lösung gegangener Cellulose wird Alkohol verwendet. Diese Methode, die eine quantitative sein soll, eignet sich nach Angabe der Verfasser besonders für die Cellulosebestimmung in menschlichen Faeces.

H. Lohrisch[3]) hat in neuester Zeit mit Hilfe dieser Methode auch die alten Angaben von v. Knieriem über die Celluloseverdauung des Hundes nachgeprüft. Er ging dabei von der sehr berechtigten Anschauung aus, daß der Verdauungskanal des Hundes in vieler Hinsicht dem des Menschen, der Cellulose verdaut, sehr ähnelt, daß also auch eine Celluloseverdauung durch den Hund a priori nicht unwahrscheinlich sei. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, daß der Hund in seiner Eigenschaft als Haustier an gemischte, cellulosehaltige Nahrung schon längst gewöhnt ist, und wenn man an die orientalischen Straßenhunde denkt, deren tägliche Nahrung zum großen Teile aus cellulosereichen Abfällen pflanzlicher Nahrungsmittel (Schalen von Trauben, Melonen, Gemüsereste usw.) besteht, so ist die Möglichkeit einer Celluloseverdauung durch den Hund nicht ohne weiteres zu verneinen.

---

[1]) F. Hoppe-Seyler, Über Huminsubstanz, ihre Entstehung und ihre Eigenschaften. Zeitschr. f. phys. Chem. 13, 77, 1889.

[2]) G. Lange, Zur quantitativen Bestimmung der Cellulose. Zeitschr. f. phys. Chem. 14, 283, 1890.

[3]) H. Lohrisch, Über die Verdauung und Verwertung der Rohfaser und Cellulose im tierischen und menschlichen Organismus. Centralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. des Stoffwechsels, 1907, Heft 23.

Lohrisch fand nun bei seinen an 2 Hunden ausgeführten Versuchen, daß von der verfütterten Cellulosemenge 25 bis 30% verschwanden. Er kommt also zu dem Schlusse, daß tatsächlich eine Celluloseverdauung auch im Darmkanal der Carnivoren stattfinden könne.

Obwohl verschiedene Gründe für die Wahrscheinlichkeit dieser Befunde sprechen, erscheint eine kritische Betrachtung und Nachprüfung dieses Befundes um so mehr geboten, als die klaren Ergebnisse der alten Autoren nicht ohne weiteres als bedeutungslos erachtet werden können.

Lohrisch verfuhr bei seinen Versuchen folgendermaßen: Er stellte sich aus Weißkraut mit der von ihm und Simon publizierten Methode „Cellulose" dar, vermischte diese mit Fleisch und verfütterte dieses Gemisch an die Versuchstiere, die zur Abgrenzung der Celluloseperiode in einer Vorperiode Knochen und dann mit Carmin gefärbtes Fleisch und in einer Nachperiode ebenso gefärbtes Fleisch und dann Knochen erhielten. Der auf diese Weise abgegrenzte Kot der Celluloseperiode wurde gesammelt, getrocknet und in ihm nach der Simon-Lohrischschen Methode der Cellulosegehalt ermittelt.

Gegen diese Versuchsanordnung sind drei Bedenken zu erheben:

1. Lohrisch verabreicht in seinen 3 Versuchen an Hund I a) 14,5 g, b) 12,47 g; an Hund II 5,22 g Cellulose. Es geht hieraus nicht hervor, ob es sich um lufttrockene Cellulose oder um absolut trockene Cellulose handelt. Da die Cellulose beim Liegen an der Luft in kurzer Zeit mehrere Prozent Wasser, wir fanden 7 bis 8 Prozent, annimmt, bei den Kotanalysen aber natürlich absolut trockene Cellulose bestimmt wird, muß bei Nichtberücksichtigung des Wassergehaltes der verfütterten Cellulose ein Fehler zugunsten einer Celluloseverdauung entstehen.

2. In gleicher Weise geht aus der Schilderung Lohrischs nicht hervor, ob der Aschegehalt der verfütterten Cellulose in Anrechnung gebracht worden ist. Da bei der Analyse des Kotes aschefreie Cellulose bestimmt wird, tritt bei Nichtberücksichtigung des Aschegehaltes der verfütterten Cellulose ebenfalls ein Fehler ein, der eine Celluloseverdauung vortäuschen kann.

3. Lohrisch verfüttert Cellulose, die nach seinem Verfahren hergestellt wurde und analysiert dann den Kot, in dem sich diese

Cellulose befindet, nach demselben Verfahren, mit dem die verfütterte Cellulose hergestellt worden ist. Diese Art der Untersuchung gibt zu Bedenken Anlaß, weil es sehr wohl denkbar ist, daß bei der zweiten Behandlung der schon einmal dem gleichen Verfahren unterworfenen Cellulose ein Verlust an Cellulose entsteht. Der Beweis, daß dies nicht der Fall ist, ist bisher nicht erbracht worden. Würde die nach diesem Verfahren hergestellte Cellulose bei einer nochmaligen ebensolchen Behandlung einen Substanzverlust erleiden, so würde es nicht Wunder nehmen können, wenn im Kote weniger Cellulose als verfüttert war, aufgefunden wird. Die fehlende Cellulose wäre dann aber nicht als „verdaut" anzusehen.

Man erkennt aus dem Vorstehenden, daß eine Nachprüfung der Versuche Lohrischs unter Vermeidung der genannten Fehlerquellen geboten erscheint. Eine solche einwandsfreie Nachprüfung ist derart auszuführen, daß man dem Versuchstiere, dessen Darmkanal von allen Resten früherer cellulosehaltiger Nahrung durch längere Fleischfütterung befreit worden ist, eine cellulosehaltige Versuchsmahlzeit, deren Cellulosegehalt vorher analytisch ermittelt wird, verabreicht und dann bei weiterer cellulosefreier Fütterung den von dieser Versuchsmalzeit stammenden Kot sammelt und hierin nach derselben Methode wie bei der Futteranalyse den Cellulosegehalt ermittelt.

Einen solchen Versuch haben wir angestellt und uns zunächst zur analytischen Bestimmung der Cellulose der Methode von Simon-Lohrisch bedient. Diese führten wir nach Lohrischs[1]) Angaben wie folgt aus:

Von dem lufttrocken gemachten, fein zermahlenen und gut durchmischten Kote werden 2 g in einem $^1/_2$ l fassenden Becherglas (Jenenser) mit 100 ccm heißen Wassers versetzt, hierin 100 g Ätzkali aufgelöst und die Lösung nach Beendigung der äußerst lebhaften Reaktion (Aufschäumen und starke Hitzeentwicklung) 1 Stunde lang auf dem Wasserbade erhitzt. Nach dem Erkalten werden zur Oxydation und Aufhellung des dunkel gefärbten Reaktionsproduktes 5 ccm Wasserstoffsuperoxyd zugegeben. Nach Beendigung der dabei eintretenden Reaktion werden durch das halbe Volumen 95 $^0/_0$ igen Alkohols, event. unter Zugabe von 10 ccm Eisessig, um Vermischung herbeizuführen, in Lösung gegangene Anteile der Cellulose ausgefällt. Dann wird durch ein gehärtetes Filter

[1]) H. Lohrisch, Über die Bedeutung der Cellulose im Haushalte des Menschen. Zeitschr. f. phys. Chem. 47, 200, 1906.

abfiltriert, der Filterrückstand, die Cellulose, mit heißem Wasser ausgewaschen, auf ein gewogenes Filter gebracht und hier nochmals gründlich mit heißem Wasser, heißer verdünnter Essigsäure, heißem Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen. Filter + Rückstand wird getrocknet gewogen, verascht und unter Abrechnung der Asche die aschefreie Cellulose ermittelt.

Der Versuch gestaltete sich nun wie folgt:

Versuch 1 (starker Dachshund).

Tag:	Fütterung:	
1. bis 4.	Fleisch	
5.	Fleisch mit Carmin	
6.	Fleisch mit 40 g präpariertem Weißkraut	Sammeln des Kotes.
7.	„ „ 40 g „ „	
8. bis 12.	Fleisch	

Der Hund setzte vom 6. bis 12. Tage eine Kotmenge ab, die lufttrocken 76,85 g wog.

Von dem lufttrockenen Kote sind mit der Methode von Simon und Lohrisch folgende Bestimmungen ausgeführt worden:

1. 2 g Trockenkot ergaben bei mehreren nebeneinander vorgenommenen Analysen:

a) 0,1845 g b) 0,1930 g c) 0,1955 g aschefreie Cellulose.

2., 3. Da nach 1stündigem Erhitzen noch nicht Aufhellung eingetreten war, wurden die Analysen noch eine weitere $^{1}/_{2}$ Stunde auf dem Wasserbade belassen.

2 g Trockenkot gaben dann:

2a) 0,2035 g; 2b) 0,1980 g; 3a) 0,1795 g; 3b) 0,1880 g aschefreie Cellulose.

Die Analysen zeigen eine wenig befriedigende Übereinstimmung, auf deren Ursache wir später zurückkommen werden. Hier sei nur betont, daß Analysenfehler nicht vorliegen. Wir haben solche Schwankungen bei den zahlreichen Analysen, die wir zwecks Nachprüfung der Simon-Lohrischschen Methode ausführten, stets beobachtet. Rechnet man die erhaltenen Analysenwerte auf die im Kote wiedergefundene Menge um, so ergibt sich:

1a) 7,09 g	b) 7,42 g	c) 7,51 g	im Mittel:	7,34 g
2a) 7,82 „	b) 7,61 „		„ „	7,72 „
3a) 6,90 „	b) 7,22 „		„ „	7,06 „
			Gesamt-Mittel:	**7,37 g**

Das verfütterte Weißkraut wurde ebenfalls nach derselben Vorschrift analysiert; 2 g angewendete Substanz ergaben:

a) 0,1830 g b) 0,1840 g aschefreie Cellulose.

Die verfütterten 80 g Weißkraut enthielten also **7,34 g** Cellulose.

Die Betrachtung der Versuchsergebnisse lehrt zweierlei. Zunächst geht aus ihnen hervor, daß eine Verdauung von

Cellulose bei unserem Versuchstiere nicht stattgefunden hat. Weiter fällt aber die schlechte Übereinstimmung der Kotanalysen auf, deren Resultate zwischen Grenzwerten schwanken, die für eine quantitative Bestimmungsmethode zweifellos zu weit auseinander liegen. Die gute Übereinstimmung des Mittelwertes der Kotcellulose mit der für die verfütterte Cellulose gefundenen Zahl vermag hieran nichts zu ändern.

Der Ausfall des Versuches bestätigt also unsere Vermutung, daß bei den Versuchen Lohrischs eine Celluloseverdauung durch fehlerhafte Methodik vorgetäuscht worden ist. Um die Probe auf diesen Schluß zu machen, haben wir mit demselben Versuchstiere einen weiteren Versuch angestellt, bei dem das Tier genau wie bei Lohrisch Cellulose (dargestellt nach Simon und Lohrisch) erhielt und dann im Kote mit der Lohrischschen Methode die wiedergewonnene Cellulose ermittelt wurde.

Versuch 2 (starker Dachshund).

Tag:	Fütterung:	
13. bis 15.	Fleisch	
16.	1. Fleisch mit Carmin gefärbt	Sammeln des Kotes.
	2. Fleisch mit 12 g Cellulose	
17. bis 22.	Fleisch	

Der Kot wog lufttrocken 63 g.

3 g Trockenkot ergaben nach Simon und Lohrisch:

1 a) 0,2040 g, 1 b) 0,2040 g, 2 a) 0,2310 g, 2 b) 0,2300 g aschefreie Cellulose.

Berechnung der Resultate: 12 g verfütterte Cellulose entsprechen 11,241 g aschefreier Trockensubstanz.

	1.	2.
Verfüttert	11,241 g	11,241 g
Wiedergefunden	4,284 „	4,841 „
Verschwunden	6,957 g	6,400 g
in Prozenten	61,89 %	56,93 %

Dieser Versuch bestätigt die Richtigkeit unserer Voraussetzungen. Obwohl der Versuchshund keine Cellulose zu verdauen vermag, wie dies der erste Versuch zeigte, ist dennoch mit einer Anordnung, die der des Lohrischschen Versuches analog war, eine Celluloseverdauung vorgetäuscht worden. Der Versuch zeigt aber auch weiter, daß das Verschwinden der Cellulose darauf zurückzuführen ist, daß die Cellulose durch die abermalige Behandlung mit KOH, H_2O_2 usw. einen Substanzverlust erleidet.

Zahlreiche Versuche, über die wir an anderer Stelle berichten werden, zeigten uns, daß die Behandlung mit 50% KOH einen regelmäßigen Substanzverlust zur Folge hat. Hauptsächlich ist es aber, wie uns ebenfalls Versuche zeigten, das Wasserstoffsuperoxyd, welches die Cellulose in alkalischer Lösung sehr leicht oxydiert und somit der quantitativen Bestimmung entzieht, wie dies schon nach den Befunden von Bumke und Wolffenstein[1]), Matthes und St eitberger[2]) wahrscheinlich ist. Wir konnten z. B. Papiercellulose in 50% KOH durch fortgesetzten Zusatz (4 bis 5 × je 5 ccm) von H_2O_2 (Perhydrol Merck) bis auf einen minimalen, wolkigen Rückstand oxydieren und zum Verschwinden bringen. Dadurch, daß das Perhydrol nicht in jedem Falle gleich intensiv wirkt, sondern diese Wirkung von äußeren Umständen (Dauer des Erhitzens, Abkühlens nach dem Erwärmen auf dem Wasserbad und die Filtration, Beschaffenheit des Perhydrols u. dgl.) abhängig ist, werden unserer Meinung nach die oft großen Schwankungen der Analysenresultate (vgl. letzten Versuch) hervorgerufen.

Man erkennt hieraus, daß die Methode von Simon und Lohrisch zur Lösung derartiger Fragen wie die vorliegenden am besten gar nicht oder nur unter ganz besonderen Vorsichtsmaßregeln verwendet werden darf. Auch sie ist nicht das, was der Chemiker unter einer quantitativen Methode versteht.

Da diese Versuche zur definitiven Lösung der Frage nach dem Verdauungsvermögen von Cellulose seitens des Hundes nicht genügend erschienen, zumal auch wir uns dabei der genannten Methode bedienten, haben wir noch zwei weitere Versuche angestellt und bei diesen die Methodik derart verändert, daß Irrungen möglichst vermieden wurden.

Zunächst haben wir zur Fütterung nicht Cellulose oder präpariertes Weißkraut, das, mit Fleisch vermischt, verabreicht wurde, sondern getrocknetes und dann gekochtes Weißkraut verwendet. Dieses wurde, nachdem der Hund durch mehrtägige Fleischfütterung cellulosefrei gemacht worden war, in zwei Portionen verabreicht, dann folgte wiederum bis zum Ver-

---

[1]) O. Bumke und R. Wolffenstein, Über Cellulose. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 2493, 1899.

[2]) H. Matthes und F. Streitberger, Über die Zusammensetzung der Kakaorohfaser. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 40, 4195, 1907.

schwinden der Cellulosereste aus dem Kote Fleischfütterung und Sammeln des Kotes.

Zur Analyse des getrockneten Weißkrautes und des Kotes bedienten wir uns dabei einer Methode, die ein Mittelding zwischen der ursprünglichen Methode von Lange und der von Simon und Lohrisch darstellt. Wenn auch sie keineswegs in jeder Richtung als quantitativ bezeichnet werden kann, so vermeidet sie doch wenigstens die große durch den H_2O_2-Gebrauch entstehende Fehlerquelle der Lohrischschen Methode und ist andererseits bequemer als die Methode von Lange zu handhaben. Diese Methode führen wir wie folgt aus:

1 bis 2 g fein gemahlener Substanz wird in ein Jenenser Becherglas gebracht, mit 100 ccm kaltem Wasser verrührt und nach und nach 100 g KOH in Stangen eingetragen. Sobald die Lösung erfolgt ist, wird auf dem siedenden Wasserbade eine Stunde lang erhitzt, dann durch ein gehärtetes Schleicher-Schüllsches Filter abfiltriert und auf diesem so lange mit heißem Wasser nachgewaschen, bis das Filtrat ungefärbt abläuft. Dann spritzt man den Rückstand vom Filter in das Becherglas zurück, filtriert durch ein gewogenes, quantitatives Filter und wäscht so lange mit heißem Wasser nach, bis die Reaktion des Filtrates nicht mehr alkalisch ist. Hierauf wäscht man mit 5%iger heißer Essigsäure 3 mal, spült abermals mit heißem Wasser nach (bis die saure Reaktion verschwindet) und wäscht schließlich in der üblichen Weise mit Alkohol und Äther nach.

Das Filter mit dem grauweißen Inhalte wird bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, durch Wägung die aschehaltige Cellulose bestimmt und nach dem Veraschen die Asche und durch Rechnung die aschefreie Cellulose ermittelt.

Bei mehrmaligem Behandeln von auf diese Weise hergestellter Cellulose mit derselben Methode erhält man in jedem Falle höchstens einen Verlust von ca. 5 bis 7%.

Da das lufttrockene Weißkraut, welches ca. 20% Wasser enthielt, zur Analyse auf der Märkerschen Mühle fein gemahlen werden muß, wird leicht eine Veränderung des relativ hohen Wassergehaltes eintreten können. Beim Reiben zwischen den stählernen, schnell rotierenden Mahlscheiben der Mühle kann eine Erhitzung und damit Verminderung des Wassergehaltes eintreten. In diesem Falle würde man also zur Analyse ein cellulosereicheres Weißkraut ver-

wenden als verfüttert worden ist; infolgedessen würde die tatsächlich verfütterte Menge Weißkraut um ein kleines geringer sein als diejenige, die man auf Grund der Analyse als verfüttert in Rechnung setzt. Wir haben nun diesen Fehler auszuschalten versucht, indem wir die Celluloseanalyse des Weißkrautes stets auf die absolute Trockensubstanz berechneten. Beim Kot verfuhren wir derart, daß wir den gesamten Kot zunächst auf dem Wasserbade scharf trockneten, dann im Mörser ohne Verlust zerstießen, lufttrocken machten und dann als „Trockenkot" wogen. Der Trockenkot wurde dann gemahlen, wiederum an der Luft liegen gelassen und zur Analyse mit derselben Methode verwendet. Eine Berücksichtigung der absoluten Trockensubstanz wurde nicht durchgeführt, da der Kot erfahrungsgemäß beim Trocknen nicht allein Wasser, sondern auch andere Substanzen abgibt. Man hätte also nur den gesamten gemahlenen Kot trocknen können; dies ist aber, da ein quantitatives Mahlen ausgeschlossen ist, nicht durchzuführen. Durch das dem Mahlen vorangehende scharfe Trocknen hoffen wir, auch diesen Fehler tunlichst vermieden zu haben, da der Wassergehalt des Trockenkotes nur sehr gering war.

Wir glauben, mit Hilfe dieser Methodik die Versuchsanordnung so gestaltet zu haben, daß die vermeidbaren Fehlerquellen, soweit es vorläufig möglich ist, vermieden oder wenigstens auf ein sehr geringes Maß beschränkt worden sind.

Außerdem wurde bei jedem Versuche zur Kontrolle das Verhalten der Rohfaser ermittelt, wobei wir uns des Königschen Glycerin-Schwefelsäure-Verfahrens bedienten.

Versuch 3. Großer Hofhund, Rasse unbestimmt.

Tag:	Fütterung:
1. bis 3.	Fleisch.
4.	Fleisch mit Carmin gefärbt.
5. früh:	Fleisch ungefärbt.
5. abends:	100 g in Bouillon gekochtes, lufttrockenes Weißkraut.
6.	100 g gekochtes Weißkraut wie am 5. Tage.
7.	Fleisch mit Carmin gefärbt.
8. bis 9.	Fleisch.

Der Kot wurde vom 5. Tage an gesammelt, am 9. Tage wurde wieder reiner Fleischkot abgesetzt, der mit Carmin gefärbt war.

Der gesammelte Kot wog lufttrocken: 90 g.

Verfüttert wurde Weißkraut: 200 g.

Kotanalysen: 1 g Trockenkot ergab:

a) 0,1890 g, b) 0,1895 g aschefreie Cellulose. Im Mittel: 0,18925 g.

Demnach ergibt sich im Kote wiedergefundene aschefreie Cellulose: 17,03 g.

Kontrolle durch Rohfaserbestimmung.

1 g Trockenkot ergab:

a) 0,2034 g, b) 0,2030 g aschefreie Rohfaser. Im Mittel: 0,2032 g.

Im Kote also wiedergefunden: 18,29 g aschefreie Rohfaser.

Versuch 4. Dachshund (derselbe wie bei Vers. 1 und 2).

Tag:	Fütterung:
1. bis 12.	Fleisch.
13.	60 g in Bouillon gekochtes, lufttrockenes Weißkraut.
14. bis 17.	Hungerperiode.
18.	60 g gekochtes Weißkraut wie am 13. Tage.
19. bis 21.	Fleisch.

Der Kot wurde vom 13. bis 21. Tage gesammelt, an diesem Tage waren Weißkrautreste darin nicht mehr zu finden.

Der gesammelte Kot wog lufttrocken: 65 g.

Verfüttert wurde Weißkraut: 120 g.

Kotanalysen: 1 g Trockenkot ergab:

a) 0,1580 g, b) 0,1562 g, c) 0,1572 g aschefreie Cellulose. Im Mittel: 0,1571 g.

Demnach ergibt sich im Kote wiedergefundene aschefreie Cellulose: 10,21 g.

Kontrolle durch Rohfaserbestimmung:

1 g Trockenkot ergab:

a) 0,1760 g, b) 0,1770 g aschefreie Rohfaser. Im Mittel: 0,1765 g.

Im Kote also wiedergefunden: 11,47 g aschefreie Rohfaser.

Berechnung der verfütterten Cellulose:

1 g verfüttertes Weißkraut besaß eine Trockensubstanz von 0,8085 g (Mittel aus 2 Analysen).

1 g analysiertes Weißkraut besaß eine Trockensubstanz von 0,8608 g (Mittel aus 2 Analysen).

Cellulosebestimmung des Weißkrautes (von 0,8608 g Trockensubstanz): 1 g ergab:

a) 0,0880 g, b) 0,0890 g aschefreie Cellulose. Im Mittel: 0,0885 g.

Versuch 3: Verfüttert wurden 200 g Weißkraut, die einer Trockensubstanz von 161,7 g entsprachen. Da 0,8608 g trockenes Weißkraut 0,0885 g aschefreie Cellulose enthielten, waren in den verfütterten 200 g

16,62 g aschefreie Cellulose enthalten.

Versuch 4: Verfüttert wurden 120 g Weißkraut mit einer Trockensubstanz von 97,02 g. Diese entsprachen einem Cellulosegehalt von 9,98 g.

Zusammenstellung der Resultate:

	Versuch 3	Versuch 4
Verfütterte Cellulose:	16,62 g	9,98 g
Wiedergefundene Cellulose:	17,03 g	10,21 g

Hieraus ergibt sich, daß eine Celluloseverdauung in keinem der beiden Versuche stattgefunden hatte.

Kontrolle durch Rohfaserbestimmung:

Versuch 3: Verfüttert wurden 200 g Weißkraut mit 161,7 g Trockensubstanz und 17,56 aschefreier Rohfaser. Im Kote wiedergefunden: 18,29 g aschefreie Rohfaser.

Versuch 4: Verfüttert wurden 120 g Weißkraut mit 97,02 g Trockensubstanz und 10,54 g aschefreier Rohfaser. Im Kote wiedergefunden: 11,47 g aschefreie Rohfaser.

Aus beiden Versuchen geht mit voller Deutlichkeit hervor, daß bei keinem der beiden Versuchstiere weder eine Cellulose- noch eine Rohfaserverdauung beobachtet werden konnte. Das geringe Mehr, welches im Kote an Cellulose gefunden wurde, erklärt sich zwanglos dadurch, daß gewisse Kotbestandteile durch die Behandlung nicht völlig aufgelöst worden sind, wie man auch daraus entnehmen konnte, daß die bei den Kotanalysen gewonnene Cellulose stets eine bedeutend dunklere Färbung als die bei den Weißkrautanalysen erhaltene aufwies. Daß bei der Rohfaserbestimmung im Kote mehr Rohfaser, als verfüttert wurde, gefunden worden ist, darf aus denselben Gründen nicht verwundern.

Wir gelangen demnach in Bestätigung der Untersuchungen der älteren Autoren zu dem Schlusse:

Der Hund vermag Cellulose und auch Rohfaser nicht zu verdauen.

Über die Aufnahme und Ausscheidung von Radiumemanation seitens des menschlichen Organismus.

Von

F. L. Kohlrausch, Charlottenburg, und Erich Plate, Hamburg.

(Aus dem Allg. Krankenhause St. Georg, Hamburg.)

(Eingegangen am 22. Juni 1909.)

Mit 2 Figuren im Text.

Die technische und klinische Anwendung der Radiumemanation ist ebenso wie das Studium der Radioelemente eng verknüpft mit den zugehörigen Meßmethoden. Schon die Gewinnung des Radiums seinerzeit durch das Ehepaar Curie in Paris geschah in der Weise, daß die Substrate des chemischen Prozesses dergestalt weiter verarbeitet wurden, daß man durch physikalische Messungen feststellte, welcher Teil die größte Radioaktivität besaß, und daß dieser dann der weiteren Verarbeitung unterworfen wurde. Wir haben nun in der elektroskopischen Prüfung ein außerordentlich empfindliches Reagens, das beispielsweise die Natriumreaktion der Spektralanalyse noch um das Tausendfache übertrifft. Es ist möglich, mit seiner Hilfe noch Spuren von 10^{-10} g Radium bis auf wenige Prozente genau nachzuweisen. Wenn auch die bisherigen Meßinstrumente für technische Zwecke ausreichend sind, werden doch alle die Beobachter, die sich mit dem therapeutischen Nachweise der Radiumemanation beschäftigt haben, bestätigen, daß für eine ganze Reihe von Untersuchungen, z. B. Nachweis der Emanation im Urin, im Blute usw., die Messung mit außerordentlichen Schwierigkeiten verknüpft ist. Es gehört eine außerordentliche Erfahrung und Kenntnis aller Fehlerquellen dazu, um mit ihnen einwandfreie Resultate zu erzielen. Wir verweisen in

dieser Hinsicht auf die Arbeiten von Riedel[1]) sowie von Kohlrausch und Nagelschmidt[2]).

Von gleicher Bedeutung für die Therapie wie die angedeuteten Messungen ist die Frage der rationellsten Einverleibung der Emanation, die natürlich wieder basieren muß auf der Kenntnis ihres Verbleibens im Organismus. Die Frage nach diesen rationellen Anwendungsmethoden gewinnt deshalb ständig mehr an Bedeutung, seitdem man erkannt hat, daß ein wesentlicher Heilfaktor vieler Mineralquellen bzw. der Badeorte in ihrem Gehalt an Emanation zu erblicken ist. Alle diese Fragen, die zum Teil sehr strittiger Natur sind, und wie der Nachweis im Urin von den Forschern teils in bejahendem, teils in negativem Sinne gelöst sein sollen, sind abhängig von der Empfindlichkeit der zur Verfügung stehenden Meßinstrumente. Der größte Teil aller Untersuchungen ist ausgeführt worden mit dem Elster u. Geitelschen Elektroskop, dessen Leistungsfähigkeit zweifellos in vielen Fällen sich als genügend erwies. Wir haben jedoch neuerdings ein weit empfindlicheres Instrument, das Elektrometer für radioaktive Messungen nach H.W.Schmidt. Seine Empfindlichkeit übertrifft nach unseren Erfahrungen diejenige des Elster u. Geitelschen um etwa das 10fache. In gleichem Maße sind natürlich auch die Vorsichtsmaßregeln und Fehlerquellen gewachsen, und halten wir es deshalb bei der Wichtigkeit der vorliegenden Fragen für zweckmäßig, über unsere Erfahrungen mit diesem Instrument zunächst zu berichten, und daran anschließend erst unsere Versuche mitzuteilen. Die beifolgenden Skizzen dienen als Erläuterung für das Instrument, dessen Beschreibung und Anwendungsweise wir gleichfalls ausführlicher anführen:

Elektrometer für radioaktive Messungen.

Der Untersuchungsapparat U (vgl. Fig. 1) besteht aus 2 Teilen: dem eigentlichen Elektrometer E und dem Zerstreuungsgefäß Z. Der Mantel m des Zerstreuungsgefäßes Z ist ein Messingzylinder, der unter Zwischenschaltung eines Lederringes luftdicht auf die obere Wand i des Elektrometergehäuses aufgeschraubt werden kann. Die innere Elektrode

---

1) Riedel, Med. Klinik 1909, Nr. 12.

2) Kohlrausch u. Nagelschmidt, Zeitschr. f. diät. u. physikal. Ther. 12, 2, 1908; diese Zeitschr. 15, 123, 1908.

ist ein dünner Draht *k*, der mit seinem unteren Ende in einen Messingstift *e* hineinpaßt. Dieser Stift ragt durch den isolierenden Bernstein *b* hindurch von oben in das Innere des Elektrometergehäuses hinein und stellt die Verbindung zwischen der inneren Elektrode *k* und dem Aluminiumblättchen *a* her. *a* ist an dem Blättchenträger *s* angeklebt; der Blättchenträger selbst wird an den durch den Bernstein *b* hindurchgehenden Metallstift *e* angeschraubt. Das Blättchen kann beim Transport des Instrumentes durch die verschiebbare Backe *o* geschützt werden. Die Ablesung der Blättchenstellung wird durch einen am Blättchen befestigten Quarzfaden erleichtert und geschieht mit Hilfe eines Ablese-

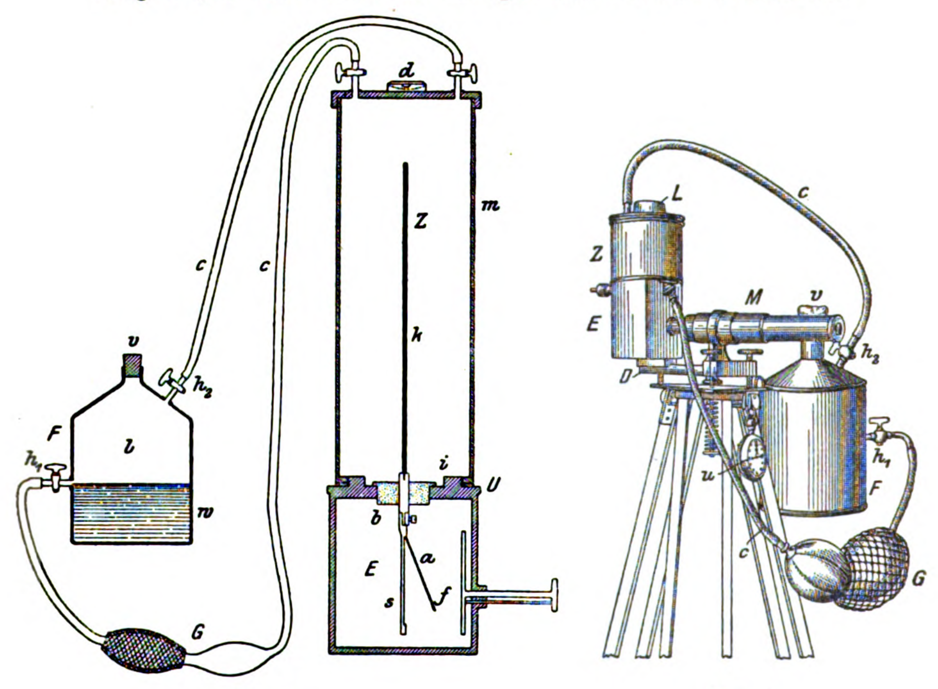


Fig. 1. Fig. 2.

mikroskops durch zwei sich gegenüberstehende Glasfenster *f* hindurch, welche in die Vorder- und Rückwand des metallenen Elektrometergehäuses eingekittet sind. Beobachtet wird der Schnittpunkt des Quarzfadens (bzw. dessen einer Kante) mit einer durch die Okularskala laufenden horizontalen Linie. Der Faden soll am Anfang (*0*) und Ende (*10*) der Skala scharf im Gesichtsfeld erscheinen. Ist das nicht der Fall, so muß das Mikroskop verstellt oder der Blättchenträger *s* etwas gedreht werden (nach Abschrauben des rückseitigen Gehäusedeckels).

Ablesemikroskop *M* (vgl. Fig. 2) und Untersuchungsgefäß sind fest miteinander verbunden und auf einem Dreifuß *D* montiert. Die Justierung des Instrumentes geschieht mit Hilfe einer auf dem Deckel des Zer-

streuungsgefäßes Z aufgeschraubten Libelle L und durch die Stellschrauben am Dreifuß.

Die Ladung der inneren Elektrode wird mit einem durch die Rückwand des Elektrometergehäuses isoliert hindurchgehenden, geeignet gebogenen Messingdraht l ausgeführt. Beim Laden liegt der Draht am Streifen a, beim Gebrauch am Gehäuse an. Das Laden geschieht am einfachsten in der Weise, daß man in das Mikroskop hineinsieht, mit der linken Hand den Ladehebel umlegt, mit der rechten Hand dem Metalldraht eine geriebene Siegellack- oder Hartgummistange nähert und den Ladehebel dann zurückdreht, wenn das Blättchen am Anfang der Skala (0) oder noch etwas weiter links (im Gesichtsfelde) steht. Bei einiger Übung ist es nicht schwer, das Elektrometer genau bis zu der gewünschten Spannung aufzuladen.

Für viele Zwecke genügt es, wenn die Skala des Okularmikrometers in relativem Maße geeicht ist. Man bestimmt zu diesem Zwecke die Geschwindigkeit des Blättchenwanderns an verschiedenen Stellen der Skala, wenn sich ein Radiumpräparat in der Nähe des Apparates befindet. Die Zeit zum Durchwandern eines bestimmten Teiles der Skala ist dann ein Maß für die Spannungsdifferenz zwischen den betreffenden Teilstrichen. — Um die Skala in Volt zu eichen, ist noch die Kenntnis der Blättchenstellung bei zwei bekannten an die innere Elektrode gelegten Spannungen nötig.[1])

Auch bei Abwesenheit radioaktiver Substanzen wird das Instrument stets einen Ladungsverlust anzeigen. — Dieser Ladungsverlust, die sog. „natürliche Zerstreuung", ist bei allen Messungen in Abzug zu bringen.

Zur Feststellung der Emanation von Quellwasser kann folgende Methode dienen.[2]) Die zu untersuchende Wassermenge w wird vorsichtig in die Flasche F gefüllt und mit der Luftmenge l nach Abschluß der Flasche ca. $1^1/_2$ Minuten lang geschüttelt, so daß der größte Teil der Emanation in die Luft entweicht. Dann wird die mit Emanation angereicherte Luft nach Öffnung der beiden an F befindlichen Hähne h_1 und h_2 durch ein Zirkulationsgummigebläse G mit der im Zerstreuungsgefäß Z befindlichen Luft vermischt, die Hähne am Elektrometer geschlossen, und aus der zeitlichen Ladungsabnahme des geladenen Systems die Emanationsmenge bestimmt.

Da die zeitliche Ladungsabnahme (Zerstreuung) nach Einführen der Emanation zuerst infolge Bildung des aktiven Niederschlags ziemlich stark zu, später infolge Abklingens der Emanation langsam abnimmt, so macht man praktischerweise die Ablesungen 3 bis 5 Stunden nach Einführung der Emanation. Die während dieser Zeit gemessene Zerstreuung ist annähernd konstant und kann am besten zur Feststellung des Emanationsgehaltes dienen. — Hat man bei dieser Versuchsanordnung im

---

[1]) Vgl. H. W. Schmidt, Über Eichung und Gebrauch von Blattelektrometern. Physikal. Zeitschr. 7, 157, 1906.

[2]) Vgl. H. W. Schmidt, Über eine einfache Methode zur Messung des Emanationsgehaltes von Flüssigkeiten. Physik. Zeitschr. 6, 561, 1905.

Elektrometer die Zerstreuung V (nach Abzug der vorher ermittelten natürlichen Zerstreuung) festgestellt, so würde die ganze in 1000 ccm Wasser enthaltene Emanation die Zerstreuung bewirken:

$$\frac{1000}{w}\left[\frac{l_1+l_2+l_3}{l_3}(1+a)\frac{w}{l_1}\right]V = a\,V \text{ Volt/Sek.}$$

wo w die Wassermenge (in Kubikzentimetern), l_1, l_2, l_3 die Luftmenge (ebenfalls in Kubikzentimetern gemessen) in der Schüttelflasche, den Gebläseteilen und dem Zerstreuungsgefäß bedeutet und a ein Maß für die im Wasser zurückgebliebene Emanation ist (bei Zimmertemperatur = ca. 0,25). Zu Vergleichsmessungen berechnet man den elektrischen Strom, der von der in 1 l Wasser enthaltenen „Emanation mit ihren Zerfallsprodukten" im Elektrometer unterhalten wird:

$$i = \frac{C\,a\,V}{300}\,E\,S\,E$$

wo C die Kapazität des Elektrometers bedeutet und V in „Volt pro Sekunde" ausgedrückt sein muß, wenn der Strom i in elektrostatischen Einheiten (*E. S. E.*) gemessen wird[1]); oder man gibt die Radiummenge an, die im Zustand des radioaktiven Gleichgewichts eine der gemessenen gleiche Emanationsmenge enthält. Zu diesem Zwecke macht man denselben Versuch mit Wasser von bekanntem Radiumgehalt (etwa im ganzen ca. 3×10^{-9} g Ra.).[2])

Will man den Emanationsapparat auf Reisen direkt an den Quellen benutzen, so empfiehlt sich, um Zeitverluste zu vermeiden, die von der „Emanation allein" bewirkte Zerstreuung aus dem anfänglichen Anstieg der Zerstreuung zu berechnen.[3]) Diese ist ungefähr halb so groß als die Zerstreuung, die von der „Emanation und ihren Zerfallsprodukten" unter denselben Verhältnissen bewirkt wird.

Genauere Resultate als mit der Schüttelmethode erhält man, wenn man die Emanation durch Kochen aus der Flüssigkeit austreibt, sie unter Wasser auffängt und dann mit Luft zusammen in das vorher mit

---

[1]) Multipliziert man den im elektrostatistischen Maßsystem (E. S. E.) gemessenen Strom i mit 1000, so kommt man zu den sog. „Macheeinheiten", die bei Radioaktivitätsangaben von Quellen vielfach benutzt werden.

[2]) Da der elektrische Strom abhängig ist von den Gefäßdimensionen, hat die Angabe von „Emanationseinheiten" die meiste Berechtigung. Dabei versteht man unter Emanationseinheit nach dem Vorgange französischer Forscher die Emanationsmenge, die von 1 mg metallischem Radium in 1 Sek. entwickelt wird, also die Menge, die mit 1/470000 $= 2{,}13 \times 10^{-6}$ mg metallischen Radiums im radioaktiven Gleichgewicht steht.

[3]) Über diese Berechnungen vgl. die unter [2]) zitierte Arbeit, außerdem H. W. Schmidt und K. Kurz, Über die Radioaktivität von Quellen im Großherzogtum Hessen und Nachbargebieten. Phys. Zeitschr. 7, 209, 1906.

einer Wasserstrahlpumpe leergepumpte Elektrometer einführt.[1]) Auf diese Weise lassen sich äußerst kleine Radiummengen (bis zu 10^{-11} g) verhältnismäßig genau bestimmen und z. B. in gewöhnlichen Gesteinen nachweisen, wenn man diese in Lösung gebracht hat.[2])

Nach Beendigung eines Versuches muß man durch Abschrauben des Zerstreuungsgefäßes vom Elektrometer oder durch mehrmaliges Auspumpen desselben mit der Luftpumpe die Emanation sorfältig entfernen. Infolge des auf den Gefäßwänden zurückbleibenden aktiven Niederschlags wird die im Elektrometer gemessene Zerstreuung anfänglich viel größer sein als die natürliche Zerstreuung, jedoch in ca. 3 Stunden auf den normalen Wert herabgehen.

Auf Grund unserer Versuche sind im wesentlichen folgende Vorsichtsmaßregeln zu treffen: Das Instrument ist gegen Temperaturschwankungen außerordentlich empfindlich, und empfiehlt es sich deshalb, nur in solchen Räumen zu arbeiten, deren Temperatur als konstant angesehen werden darf. Wir haben es für notwendig erachtet, ungefähr mit jeder Ablesung, jedenfalls immer am Anfange und Ende eines Versuches die Raumtemperatur zu notieren. Schon Schwankungen von 2° innerhalb der Raumtemperatur machen jede Messung illusorisch. Man vermeidet zweckmäßig auch jedes Berühren sowie Anhauchen des eigentlichen Elektroskops, ferner haben wir nach einigen mißglückten Versuchen auch die zu untersuchende Flüssigkeit stets auf die Raumtemperatur gebracht. Unter Berücksichtigung dieser Punkte sowie aller sonst bekannten Fehlerquellen arbeitet das Instrument mit außerordentlicher Sicherheit und scheint von inneren Änderungen besonders deshalb frei zu sein, weil an dem Blättchen ein Quarzfaden befestigt ist, auf dem, wie in der Beschreibung schon erwähnt, das Okular eingestellt wird, weil ferner die Lage dieses Quarzfadens stets durch die am Instrument befestigte „Libelle“ fixiert werden kann. In gleicher Weise wie das Instrument für physiologische Untersuchungen in erster Linie in Frage zu kommen scheint, wird es für Quellwasser geringer Aktivität,

---

[1]) Vgl. Rutherford-Levin, Radioaktive Umwandlungen, Braunschweig 1907, S. 152. — Ein Referat über Emanationsmessungen erschien von H. W. Schmidt, Balneolog. Zeitg., Februar und März 1909.

[2]) Vgl. R. J. Strutt, On the distribution of radium in the earth's crust, and the earth's internal heat. Proc. Roy. Soc. (A) 77, 472 u. 78, 150, 166.

wie auch für die Untersuchungen der entsprechenden induzierten Aktivität gute Dienste leisten.

Unsere Untersuchungen fanden mit liebenswürdiger Genehmigung des Herrn Direktor Prof. Dr. Deneke im Allgemeinen Krankenhause St. Georg (Hamburg) statt und sollten zur Klärung zweier Fragen dienen:

A. Ist die Emanation — sei es auf welchem Wege sie auch einverleibt wird — im Urin nachweisbar?

B. Wird die Emanation aus dem Bade durch die Haut oder auch durch die Lungen aufgenommen?

Die zu unseren Versuchen verwandte Emanation wurde entnommen zwei Apparaten der Radiogen-Gesellschaft in Charlottenburg. Beide Apparate wurden durch den Leiter des Physikalischen Staatslaboratoriums Hamburg drei Monate geprüft.

Es betrug die von ihm beobachtete Entladung bei dem Badeapparat 9510 Volt, bei dem Trinkapparat 5592 Volt stündlich für 10 ccm.

Die einleitenden Versuche bezweckten eine genaue Kenntnis der Konstanten unseres Elektrometers und dienten im wesentlichen der Fixierung des Normalverlustes (natürliche Zerstreuung). Laut Eichungskurve des Elektrometers betrug dieser Zerstreuungskoeffizient 1,032 Teilstriche pro Stunde. Die von uns angestellten Untersuchungen ergaben im Mittel aus 13 Messungen einen normalen Spannungsabfall von 2,90 Volt, angenähert 1,1 Teilstriche pro Stunde.

A. Urinmessungen.

1. Unsere erste Messung verunglückte deshalb, weil die Meßkanne mit zuviel Flüssigkeit angefüllt war und infolgedessen ein Übersteigen der Flüssigkeit zum Zerstreuungszylinder eintrat. Nach dieser nützlichen Erfahrung wurde das Meßgefäß im Maximum stets mit 700 ccm Flüssigkeit gefüllt in der Weise, daß die Zahl der gelassenen Kubikzentimeter Urin mit destilliertem Wasser auf 700 aufgefüllt wurde. Ein Zusatz von Olivenöl und Abkühlung auf Raumtemperatur fand in jedem Falle statt.

2. Einem Bade von etwa 300 Liter Wasser von 36° C Temperatur wurden 665000 Emanationseinheiten zugesetzt; Dauer des Bades 1/2 Stunde. Der Patient erhielt in einem völlig emanationsfreien Raume einen sogenannten Draegerschen Rauchhelm mit Sauerstoffzuführung aufgesetzt[1]); nachdem der Patient das Bad bestiegen und der Rauchhelm

[1]) Dieser Helm wurde uns in dankenswertester Weise von dem Leiter der Hamburger Feuerwehr, Herrn Branddirektor Westphalen, zur Verfügung gestellt.

geschlossen war, wurde das emanationshaltige Wasser dem Bade zugesetzt. Nach dem Bade wurde der Patient mit geschlossenem Helm in ein anderes emanationsfreies Zimmer geführt, dort gründlich abgeduscht und zum Teil mit destilliertem Wasser abgespült.

Nachdem der Patient $^1/_2$ Stunde sich im Freien bewegt hatte, wurden 170 ccm Urin gelassen und dieser auf 18° abgekühlt, bei einer Raumtemperatur von 14,7°. Die ungenügende Abkühlung des Urins ist nach unseren späteren Erfahrungen sicher tadelnswert. Das Resultat der Messung ist zahlenmäßig das folgende:

1. Versuch vom 3. IV. 09.

	Raumtemp.	Zeitdauer d. Messung	Stellung d. Quarzfadens	Voltzahlen	Voltabfall pro Stunde
Normalverlust (freie Kommunikation mit der Luft)	14,7° C	5 Min.	2,2 2,0	165,1 164,7	0,4 × 12 = 4,8
170 ccm Urin (Bad mit 665000 Einh., Rauchhelm) + 530 Aq. dest. + Olivenöl. Temp. 18° C; $^1/_2$ Min. geschüttelt, $^3/_4$ Min. Luftzirkulation	14,7° C	2 Min.	4,5 4,4	170,4 170,2	0,2 × 30 = 6,0
		2 „	4,4 4,3	170,2 170,1	0,1 × 30 = 3,0
	14,7° C	6 „	4,3 4,1	170,1 169,8	0,3 × 10 = 3,0

Als Resultat dieser Messung folgt:

Der Normalverlust ist nicht ganz zutreffend bestimmt worden zu 4,8, weil Meßgefäße und Schläuche offen mit der Luft kommunizierten. Aus den Vorversuchen ist bekannt, daß der Normalverlust höchstens 3 Volt beträgt.

Das Resultat der ersten 2 Minuten unserer Messung mit 6 Volt ist sicher zu hoch gefunden, weil der Temperaturausgleich zwischen Kanne und Meßzylinder noch nicht erfolgt war. Selbst bei vollkommen gleichmäßiger Temperatur zwischen der zu untersuchenden Flüssigkeit und der Raumtemperatur tritt zu Beginn des Versuches stets ein kleines Wandern des Fadens auf der Skala von 1 bis 2 Minuten Dauer ein, vermutlich infolge von Druckschwankungen oder noch nicht beendeter Polarisation. Die Beobachtung ergibt, daß sowohl in den zweiten 2 Minuten als auch in den darauffolgenden 6 Minuten der Spannungsabfall 3 Volt beträgt, also dem Normalverluste gleich bleibt.

Ist der Patient, wie im vorliegenden Falle, von der Luft des Baderaumes nicht tangiert, so ist sicher im Urin keine Spur von Emanation zu finden. Als weitere zweckmäßige Maßregel haben wir es empfunden, entweder 2 Minuten nach der Luftzirkulation im Apparat zu warten oder diese erste Messung als nicht zutreffend anzusehen.

3. Bei einem Normalverluste von höchstens 3 Volt wurde zunächst

der normale Urin eines Patienten bestimmt. Der Versuch ergab folgendes Resultat:

2. Versuch vom 4. IV. 09.

	Raum-temp.	Zeit-dauer d. Messung	Stellung d. Quarz-fadens	Volt-zahlen	Voltabfall pro Stunde
170 ccm Normalurin + 530 ccm Aq. dest. + Olivenöl 1/2 Min. geschüttelt, dann 3/4 Min. Luftzirkulation. Temp. 16°.	15° C	2 Min.	3,0 2,96	167,0 166,9	0,1 × 30 = 3,0
		10 „	2,96 2,77	166,9 166,4	0,5 × 6 = 3,0
	15,3° C	10 „	2,77 2,52	166,4 165,9	0,5 × 6 = 3,0

Danach wurden 60 ccm Urin eines Patienten untersucht, und zwar 1/2 Stunde nachdem 100000 Einheiten per os verabreicht waren. Das Resultat dieser Messung ist aus der beifolgenden Tabelle ersichtlich.

3. Versuch vom 4. IV. 09.

	Raum-temp.	Zeit-dauer d. Messung	Stellung d. Quarz-fadens	Volt-zahlen	Voltabfall pro Stunde
60 ccm Urin nach Trinken von 100000 Einheiten	16° C	6 Min.	6,04 5,72	173,7 173,1	0,6 × 10 = 6,0
	16° C	6 „	5,72 5,56	173,1 172,8	0,3 × 10 = 3,0
		15 „	5,56 5,19	172,8 172,0	0,8 × 4 = 3,2
		20 „	5,19 4,81	172,0 171,1	0,9 × 3 = 2,7

Auch hier finden wir als feststehendes Ergebnis der Messung, daß selbst nach Einnehmen von 100000 Einheiten der Nachweis der Emanation im Urin absolut versagt.

Diese Urinmessungen sind deshalb von großem Interesse, weil vielfach angenommen wird, daß, wenn überhaupt nach Einverleibung der Emanation der Nachweis im Urin möglich sein sollte, er nach 1/2 Stunde seinen Maximalwert erreichen soll.

Wie aus den physiologischen Grundlagen bekannt ist, sind zahlenmäßige Angaben über den Befund an Emanation im Urin nach dem Trinken nur von Loewenthal gemacht worden, und zwar mit Hilfe des Elster und Geitelschen Elektroskops.

Der Patient hatte 15000 Einheiten in 15 ccm getrunken und eine Stunde später $^1/_2$ Liter Urin gelassen; hierin wurden bei einem Normalverlust von 9,9 Volt 17 Volt pro Stunde im Urin gefunden, woraus ein Plus an Emanation im Urin von 7,1 Volt resultiert. 3 Stunden später wird für $^1/_4$ Liter Urin ein Voltverlust von 12,8 gefunden, bei einem Normalverlust von 9,2 Volt. Die dabei stattgehabte Umrechnung auf 1 Liter Urin erscheint zweifellos nicht ganz richtig.

Wenngleich die von Loewenthal angewandte Methode der Messungen, die durch ein Herüberpumpen der emanationshaltigen Luft in die Metallglocke des Elektroskops statthat, die Vorzüge der hier benutzten Methode in gewissem Sinne aufweist, krankt sie doch zweifellos an dem Mangel einer genauen Ablesungsmöglichkeit. Es ist mit dem gewöhnlichen Elektroskop eine genauere Beobachtung so winziger Emanationsmengen nicht möglich; in der Regel liegen positive Resultate im Bereiche der Fehlerquellen.

Die Versuche 1 bis 3 wurden noch in folgender Weise ergänzt: Ein Patient erhielt 100000 Einheiten per os. $^1/_2$ Stunde nach dem Trinken und ferner 1 Stunde nach dem Trinken wurde sein Urin der Messung unterworfen. Der normale Urin hatte als Resultat ergeben:

4. Versuch vom 4. IV. 09.

	Raum-temp.	Zeit-dauer d. Messung	Stellung d. Quarz-fadens	Volt-zahlen	Voltabfall pro Stunde
110 ccm Normalurin + 590 Aq. dest. ohne Olivenöl	16° C	2 Min.	2,86 2,80	166,7 166,5	$0{,}2 \times 30 = 6$
		2 „	2,80 2,74	166,5 166,3	$0{,}2 \times 30 = 6$
		8 „	2,74 2,58	166,3 166,0	$0{,}3 \times \frac{60}{8} = 2{,}25$

Es ist hierbei das Olivenöl vergessen; vielleicht sind darauf die ersten Werte von 6 Volt, beobachtet in 2 Minuten, zurückzuführen, ebensogut möglich ist aber auch das bei uns stets beobachtete Schwanken des Blättchens innerhalb 1 bis 2 Minuten; jedenfalls ist der normale Urin emanationsfrei.

5. Versuch. $^1/_2$ Stunde nach der Einverleibung von 100000 Einheiten per os werden 120 ccm Urin gelassen. Die Resultate sind aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich.

5. Versuch vom 4. IV. 09.

	Raum-temp.	Zeit-dauer d. Messung	Stellung d. Quarz-fadens	Volt-zahlen	Voltabfall pro Stunde
120 ccm Urin (gelassen ½ Std. nach Trinken von 100 000 Einheiten) + 580 ccm Aq. dest. + Olivenöl. 16° C	15,4° C	2 Min.	2,27 2,21	165,2 165,1	0,1 × 30 = 3,0
	15,8° C	2 „	2,21 2,19	165,1 165,0	0,1 × 30 = 3,0
		15 „	2,19 1,90	165,0 164,4	0,6 × 4 = 2,4

6. Versuch. 1 Stunde nach dem Trinken werden vom selben Patienten 600 ccm Urin entleert und mit destilliertem Wasser und Olivenöl versetzt. Auch diese Resultate führen wir tabellarisch an, da wir nur in einer zahlenmäßigen Zusammenstellung eine ordnungsgemäße Kontrolle für möglich halten.

6. Versuch vom 4. IV. 09.

	Raum-temp.	Zeit-dauer d. Messung	Stellung d. Quarz-fadens	Volt-zahlen	Voltabfall pro Stunde
600 ccm Urin (gelassen 1 Std. nach Trinken von 100 000 Einheiten) + 100 ccm Aq. dest. + Olivenöl	15,3° C	2 Min.	3,93 3,87	169,1 169,0	0,1 × 30 = 3,0
	14,9° C	15 „	3,93 3,61	169,1 168,5	0,6 × 4 = 2,4

Die von uns gemachten Versuche über Urinmessungen werden noch entsprechend erweitert werden, da wir unsere Beobachtungen zunächst als vorläufige Mitteilung betrachten. Wir behalten uns vor, mit dem neuen Instrument eine weitere Serie von Versuchen anzustellen, um aus einer großen Reihe von Bestimmungen jeden Zweifel an der Richtigkeit der Resultate zu beseitigen.

Wären aber so erhebliche Emanationsmengen, wie sie von anderer Seite gefunden sein sollen, im Urin vorhanden, so müßte das von uns benutzte Elektroskop mit absoluter Sicherheit ein positives Resultat zeigen; denn schon bei 15 Volt

Spannungsabfall müßte das Blättchen nahezu über die ganze im Gesichtsfelde befindliche Skala wandern.

B.

Als zweites Ziel unserer Untersuchungen war die Frage zu lösen, ob die Emanation mittels der Haut oder durch die Lungen beim Bade aufgenommen wird und dementsprechend ihre Heilwirkung auszuüben vermag.

Diese Frage ist bereits von Loewenthal, soweit es sich um Bäder mit künstlichem Emanationszusatz handelte, in seiner Arbeit „Über die Wirkung der Radiumemanation auf den menschlichen Körper" geprüft worden.

Er sagt darüber, daß die Aufnahme vorwiegend oder ausschließlich durch die Lungen, nicht aber durch die äußere Haut geschieht, was ja auch mit den bekannten Tatsachen bezüglich der gasförmigen Eigenschaften der Emanation und bezüglich der Undurchlässigkeit der Haut für im Wasser gelöste Gase übereinstimmt.

Wir stimmen mit ihm überein, daß die Lösung dieser Frage für die Technik der Thermalbäder von außerordentlicher Bedeutung ist. Wir heben hervor, daß uns eine vollkommene Lösung dieser Frage noch nicht gelungen ist, und zwar sehr wahrscheinlich nur deshalb nicht, weil mit Rücksicht auf den benutzten Apparat, der für sehr empfindliche Messungen noch reserviert bleiben sollte, die Beobachtungen zu vorsichtig vorgenommen wurden. Die Ausatmungsluft wurde nicht sofort nach dem Bade untersucht, sondern frühestens $^1/_2$ Stunde später.

Die gleichfalls zur Lösung dieser Frage angestellten Untersuchungen ergaben in jedem Falle ein negatives Resultat, weshalb wir hieraus noch keine bindenden Schlüsse zu ziehen vermögen. Wir verweisen an dieser Stelle auf unsere zweite eingangs mitgeteilte Messung, die den Beweis erbrachte, daß der Patient, sobald er aus dem Baderaume Luft nicht direkt aufzunehmen vermag, natürlich auch im Urin keine Spur von Emanation zeigt. Diese Messung wird durch unser folgendes Vorgehen vervollständigt, bei dem wir den Patienten nunmehr

ohne Rauchhelm im Bade verweilen lassen; auch hier ist das Resultat, das wir im folgenden anführen, negativ.

7. Versuch vom 4. IV. 09.

	Raum-temp.	Zeit-dauer d. Messung	Stellung d. Quarzfadens	Voltzahlen	Voltabfall pro Stunde
330 ccm Urin (gelassen 1/2 Stunde nach 1/2-stündigem Bade, dem 700000 Einheiten zugefügt waren; Patient ohne Rauchhelm) + 570 ccm Aq. dest. + Olivenöl. Temp. 16° C.	16,3° C	12 Min.	4,0 3,68	169,4 168,7	0,7 × 5 = 3,5

Wir erkennen hieraus, daß ein Patient, selbst wenn er 1/2 Stunde in 700000 Einheiten badet, trotz der hohen Emanationsmenge, die doch auch im Raume vermutet werden muß, im Urin nachweisbare Emanationsmengen nicht zeigt. Das steht natürlich in Übereinstimmung mit den Versuchen, die nach dem Trinken sehr starker Emanationsmengen im Urin nichts aufzuweisen vermögen.

Die weiteren Messungen suchten nunmehr auf anderem Wege der Frage beizukommen. Ein Patient mit Rauchhelm im radioaktiven Bade müßte in der Atemluft keine Emanation aufweisen, während ein Patient ohne Rauchhelm in der Atemluft Emanation zeigen müßte. Die Versuche sind als ausreichend noch nicht anzusprechen, aus dem einfachen Grunde vermutlich, weil man zwischen Bad und Messung der Atemluft zu lange Zeit wartete aus Schonungsrücksichten für das Instrument. Jedenfalls war die Menge der Emanation, die ohne Rauchhelm gefunden wurde, zu gering, um als beweisend zu gelten. Da jedoch aus früheren Untersuchungen zur Genüge bekannt ist, daß der Patient im Bade Emanationsmengen inhaliert, so würde es hinreichen, die eine Messung mit Rauchhelm zu wiederholen und unmittelbar nach dem Bade die Messung der Atemluft anzusetzen.

Zu dem Zwecke ist es erforderlich, die Methode der Messung noch ein wenig zu modifizieren, da es sich herausgestellt hat, daß ein Teil der Atemluft für die Messung verloren geht, wenn man einfach die Atemluft direkt in die mit 700 ccm Aq. dest. gefüllte Meßkanne einbläst. Wir lassen gleichwohl die von uns gefundenen Resultate folgen.

8. Versuch vom 5. IV. 09.

	Raum-temp.	Zeit-dauer d. Messung	Stellung d. Quarz-fadens	Volt-zahlen	Voltabfall pro Stunde
Mit Rauchhelm: Atemluft $1/2$ Stunde nach Bad (20 Min.), dem 475000 Einheiten zugesetzt waren. Die Luft in 700 ccm Aq. dest. geblasen von 16° C Temp.	15,5° C	8 Min.	3,12 2,94	167,2 166,8	$0{,}4 \times 7{,}5 = 3{,}0$
		19 Min.	2,94 2,58	166,8 166,0	$0{,}8 \times \frac{60}{19} = 2{,}5$
Ohne Rauchhelm: Atemluft 25 Minuten nach gleichem Bade	15,8° C	2 Min.	2,2 2,08	165,1 164,9	$0{,}2 \times 30 = 6$
		8 Min.	2,08 1,95	164,9 164,4	$0{,}5 \times 7{,}5 = 3{,}75$
Normalverlust nach Ausspülen der Kanne	16° C	6 Min.	1,95 1,90	164,4 164,2	$0{,}2 \times 10 = 2{,}0$
Atemluft 50 Minuten nach gleichem Bade (50 Atemzüge)	16° C	2 Min.	1,84 1,79	164,3 164,0	$0{,}3 \times 30 = 9$
		4 Min.	1,79 1,72	164,0 163,8	$0{,}2 \times 15 = 3{,}0$
		6 Min.	1,72 1,60	163,8 163,5	$0{,}3 \times 10 = 3{,}0$

Zum Schluß haben wir noch Untersuchungen angestellt, die die Atemluft von Patienten zum Gegenstande hatten, welche emanationshaltiges Wasser getrunken hatten. Auch bezüglich dieser Versuche gelten die von uns gemachten Einschränkungen, hier jedoch nur insofern, als sie nicht als quantitative Versuche anzusehen sind, weil bei der Anordnung nicht die volle Atemluft zur Geltung kommen konnte. Gleichwohl halten wir es für nützlich, auch solche Versuche mitzuteilen, da man aus den Fehlern in der Regel mehr zu ersehen vermag als aus glatt gelungenen Versuchen. Vielleicht geben unsere Messungen die Anregung, mit Hilfe des hier zugrunde gelegten Instrumentes ähnliche Untersuchungen in diesem Sinne auszuführen. Der Patient erhielt 50000 Einheiten Emanationswasser. 4 Stunden später wurden 5 Atemzüge direkt in das Wasser unserer Meß-

kanne geblasen; nachdem der Luftraum mit dem Wasser geschüttelt war, wurde die Untersuchung vorgenommen.

Das Resultat ist in unserer Tabelle 9 zusammengestellt.

9. Versuch vom 5. IV. 09.

	Raum-temp.	Zeit-dauer d. Messung	Stellung d. Quarz-fadens	Volt-zahlen	Voltabfall pro Stunde
Normalverlust	13,6° C	10 Min.	7,3 6,9	176,2 175,4	$0,8 \times 6 = 4,8$
	14° C	10 Min.	6,9 6,6	175,4 174,9	$0,5 \times 6 = 3,0$
	14° C	10 Min.	6,6 6,4	174,9 174,5	$0,4 \times 6 = 2,4$
5 Atemzüge, nachdem 4 Stunden vorher 50000 Einheiten getrunken waren	14,3° C	1 Min.	5,62 5,55	173,0 172,8	$0,2 \times 60 = 12$
		1 Min.	5,55 5,51	172,8 172,7	$0,1 \times 60 = 6$
		1 Min.	5,51 5,46	172,7 172,6	$0,1 \times 60 = 6$
		1 Min.	5,46 5,42	172,6 172,5	$0,1 \times 60 = 6$
	14,5° C	2 Min.	5,42 5,36	172,5 172,3	$0,2 \times 30 = 6,0$
		9 Min.	5,36 5,15	172,3 171,9	$0,4 \times \frac{60}{9} = 2,66$
	14,8° C	6 Min.	5,15 5,01	171,9 171,7	$0,2 \times 10 = 2$
		9 Min.	5,01 4,76	171,7 171,0	$0,7 = \frac{60}{9} = 4,7$
		30 Min.	5,62 4,76	173,0 171,0	$2 \times 2 = 4$

Das geringe Plus an Emanation gegenüber dem Normalverluste ist nicht als beweisend anzusehen.

Der nächste Versuch wurde angestellt mit einem Patienten, der 11000 Einheiten getrunken hatte; 40 Minuten nach der Einverleibung wurde die Atemluft untersucht. Das Resultat folgt anbei.

10. Versuch vom 5. IV. 09.

	Raum-temp.	Zeit-dauer d. Messung	Stellung d. Quarz-fadens	Volt-zahlen	Voltabfall pro Stunde
Atemluft (20 Atemzüge) 40 Minuten nach Trinken von 11000 Einheiten	16° C	3 Min.	1,30 1,19	162,9 162,6	0,3 × 20 = 6
		5 Min.	1,19 1,03	162,6 162,1	0,5 × 12 = 6

Es scheint ein Plus von 3 Volt vorhanden zu sein. Zur schärferen Durchführung der Messung erhielt der Patient darauf 5000 Einheiten zu trinken. 6 Minuten später wurden 5 Atemzüge in die Meßkanne gebracht; das Ergebnis ist wie folgt:

11. Versuch.

	Raum-temp.	Zeit-dauer d. Messung	Stellung d. Quarz-fadens	Volt-zahlen	Voltabfall pro Stunde
Atemluft (5 Atemzüge) 6 Minuten nach Trinken von 5500 Einheiten. Vor Beginn der Messung 2 Minuten gewartet	16° C	2 Min.	6,00 5,89	173,7 173,4	0,3 × 30 = 9
		2 Min.	5,89 5,78	173,4 173,1	0,3 × 30 = 9
		2 Min.	5,78 5,67	173,1 172,8	0,3 × 30 = 9
	16,2° C	4 Min.	5,67 5,42	172,8 172,3	0,5 × 15 = 7,5
	16,5° C	6 Min.	5,42 5,10	172,3 171,8	0,5 × 10 = 5,0

Hier erkennt man ganz deutlich, daß eine — wenn auch nicht sehr erhebliche — Emanationsmenge in der Atemluft vorhanden ist. Wir vergleichen das letzte Resultat mit den Emanationsmengen, die in früheren Versuchen gefunden sind.

Auf S. 155 dieser Zeitschr. 15, Heft 2, findet sich folgender Versuch geschildert: Normale Atemluft 22 Volt; dieselbe Atemluft, 5 Min. nach Einverleiben von 2000 Einheiten in 10 ccm = 33 Volt. Somit ein Plus von 11 Volt; jedenfalls in annäherndem Maße identische Werte, wenn man berücksichtigt, daß in beiden Fällen die Versuchsgrundlage für quantitative Messungen zweifellos nicht ausreichen dürfte.

Wir fassen das Ergebnis unserer Untersuchungen dahin zusammen, daß wir glauben, den Nachweis geführt zu haben, daß trotz gegenteiliger Behauptungen selbst mit dem hier be-

nutzten, äußerst empfindlichen Meßinstrumente der Nachweis der Emanation im Urin nicht gelingt,

1. wenn der Patient 100000 Einheiten getrunken hat, und zwischen Trinken und Messen $^{1}/_{2}$ Stunde und mehr vergangen ist; nach gegenteiliger Ansicht soll aber gerade nach $^{1}/_{2}$ Stunde das Maximum der Ausscheidung im Urin stattfinden;

2. daß nach emanationshaltigen Bädern bis zu 700000 Einheiten ebenfalls der Nachweis im Urin nicht zu erbringen ist, ganz gleich, ob der Patient die Luft im Baderaume einzuatmen vermag oder nicht, also mit Rauchhelm;

3. daß alle Voraussetzungen, die dem Befunde im Urin grundlegende Bedeutung für die Therapie zulegen, nicht angängig sind.

Weiter lassen unsere Untersuchungen mit großer Wahrscheinlichkeit schon darauf schließen, daß eine Aufnahme der Emanation nicht durch die Haut, sondern nur durch die Lunge erfolgt; allerdings ist es erforderlich, die Messung so zu gestalten, daß

1. sehr bald nach dem Bade oder dem Trinken die Messung der Atemluft vorgenommen werde;

2. für diese Untersuchungen quantitative Bestimmungsmöglichkeiten für den vorliegenden Meßapparat geschaffen werden, was — wie wir später zeigen werden — ohne weiteres möglich ist.

Wir werden ferner die Versuche noch in der Form ausgestalten, daß wir versuchen, dem Einwande zu begegnen, die in der Atemluft gefundene Emanation stammte nicht aus der Lunge, sondern die aus der Lunge kommende Luft habe dieselbe etwa aus der Mundhöhle mit fortgerissen. Zu dem Zwecke findet sich vielleicht gelegentlich einmal ein Kranker, der gezwungen ist, eine Kanüle zu tragen, so daß man die Exspirationsluft zu gewinnen vermag, ohne daß sie die Mundhöhle passiert hat.

Ein positiver Nachweis in der durch die Kanüle ausgeatmeten Luft würde beweisen, daß die Emanation sicher den Blutkreislauf passiert hat.

Über die Wirkung von Organzellen auf Bakterienextrakte.

Von

H. Toyosumi, Tokio (Japan).

(Aus dem hygienischen Institut der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 24. Juni 1909.)

Die rätselhafte Erscheinung, daß das in geringer Menge eingeführte Antigen die Entstehung einer großen Menge von Antikörpern zur Folge hat, hat P. Ehrlich damit erklärt, daß die Einführung der Antigene in keinem direkten Zusammenhang mit der Entstehung der Antikörper steht, sondern daß Veränderungen an Zellen und der damit verbundene Reiz die Ursache hierfür abgeben. Von dieser Auffassung geleitet, haben eine Anzahl von Autoren mit wechselndem Erfolge die im Blute vorhandenen Antikörper in den Organzellen nachzuweisen gesucht.

In neuerer Zeit haben Weil und Braun[1]) in den Organzellen künstlich immunisierter Tiere mit einer ziemlich einwandfreien Methode Antikörper gesucht. Die Versuche beider Autoren verliefen aber vollkommen negativ, und sie kamen zu dem Schlusse, daß die Antikörper, wenn sie überhaupt in den Organzellen vorhanden sind, unwirksam und wasserunlöslich sein müßten, vielleicht infolge besonderer Bindung im Sinne Ehrlichs.

Die Versuche, die wir anstellten und im nachfolgenden wiedergeben wollen, machten es sich zur Aufgabe, zu prüfen,

---

[1]) Biochem. Centralbl. 1909.

ob in den Organzellen Gruppen vorhanden sind, denen die Fähigkeit zukommt, gelöste Bakterienstoffe zu binden resp. unwirksam zn machen. Nach den Vorstellungen Ehrlichs mußte dies ja der Fall sein. Diese Versuche haben wir auch aus dem Grunde unternommen, weil es uns in früheren Experimenten nicht gelungen war, eine Verbindung von Serumantikörpern mit den sogenannten freien Receptoren zu erzielen, was uns in Übereinstimmung mit Weil und Axamit zu einer Ablehnung der freien Receptoren führte.

Wir wählten als Versuchsobjekt Choleravibrionenextrakt, dessen Wirkung nach jeder Richtung hin leicht festzustellen war, sowohl durch Präcipitation als auch durch Bakteriolyse- und Hämolysehemmung.

Was die Versuchstechnik anbelangt, so ist folgendes zu bemerken. Die frisch gewonnenen kleinen Stücke verschiedener Organe von normalen Meerschweinchen resp. normalen Kaninchen wurden mit physiologischer NaCl-Lösung im Mörser verrieben, hierauf ein- oder mehrmals gewaschen. Nachdem das Waschwasser vollständig mit Filtrierpapier entfernt war, wurde die Organemulsion mit dem Choleraextrakte, der auf gewöhnliche Weise (1 Kollesche Schale auf 20 ccm NaCl-Lösung) hergestellt war, im Brutschrank belassen. Nachdem der Extrakt klar zentrifugiert war, wurden die Versuche angestellt. Die Organemulsionen wurden nach dem Waschen im möglichst wasserfreien Zustande gewogen. Das Gewicht betrug in den verschiedenen Versuchen zwischen 0,3 bis 0,7 g. Die Menge des Extraktes ist in den einzelnen Versuchen angegeben. Leukocyten, die durch intraperitoneale Injektion von Bouillon von Meerschweinchen gewonnen wurden, standen auch manchmal zur Verfügung. Der unbehandelte Extrakt, welcher ebenso wie die übrigen Röhrchen allen Prozeduren ausgesetzt wurde, wurde stets als Kontrolle untersucht.

A. Präcipitationsversuche.

Zunächst haben wir ein Immunserum, welches von einem mit abgetöteten Choleravibrionen vorbehandelten Kaninchen stammte, auf seine Präcipitationswirkung austitriert. Dasselbe rief mit je 0,5 ccm eines mit physiologischer NaCl-Lösung 2fach verdünnten Choleraextraktes in der Dosis von 0,1 ccm nach 2^h bei 42° C deutliche Flockung und von 0,01 ccm Trübung hervor.

Versuch 1.

Mit Meerschweinchenorganen.

Die Organe wurden einmal mit NaCl-Lösung gewaschen; das Knochenmark mit 1,2 ccm, die Leber mit 3 ccm und die Milz mit 2 ccm von 2fach verdünnten Choleraextrakt 3ʰ bei 37° C behandelt.

Menge des Immunserums	Mit Knochenmark behand. Extrakt 0,5		Mit Leber behand. Extrakt 0,5		Mit Milz behand. Extrakt 0,5		Unbehand. Extrakt 0,5	
	2ʰ bei 37° C	12ʰ bei Z. T.	2ʰ bei 37° C	12ʰ bei Z. T.	2ʰ bei 37° C	12ʰ bei Z. T.	2ʰ bei 37° C	12ʰ bei Z. T.
Immunserum 0,1	Spürchen Trübung	Flockung, trüb	Spürchen Trübung	Flockung, trüb	Ø	Ø	Flockung, trüb	Satz, klar
Ø + NaCl 0,1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Versuch 2.

Mit Meerschweinchenorganen.

Die Organe wurden einmal mit NaCl-Lösung gewaschen; das Knochenmark mit 1,3 ccm, die Leber, Niere und das Gehirn mit je 3 ccm und die Milz mit 1,7 ccm von 2fach verdünntem Choleraextrakte 2ʰ bei 37° C behandelt.

Menge des Immunserums	Mit Gehirn behand. Extrakt 0,5		Mit Knochenmark behand. Extr. 0,5		Mit Leber behand. Extrakt 0,5		Mit Milz behand. Extrakt 0,5		Mit Niere behand. Extrakt 0,5		Unbehand. Extrakt 0,5	
	2ʰ bei 37° C	12ʰ bei Z. T.	2ʰ bei 37° C	12ʰ bei Z. T.	2ʰ bei 37° C	12ʰ bei Z. T.	2ʰ bei 37° C	12ʰ bei Z. T.	2ʰ bei 37° C	12ʰ bei Z. T.	2ʰ bei 37° C	12ʰ bei Z. T.
Immunserum 0,1	Ø	Trübung	Ø	Flockg., trüb	Ø	Flockg., trüb	Ø	Ø	Flockg.	Flockg., trüb	Flockg.	Satz, klar
Ø + NaCl 0,1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Bei beiden Versuchen zeigte die Probe von 0 1 ccm Immunserum mit 0,5 ccm NaCl-Lösung keine Spur von Trübung.

Versuch 3.

Mit Kaninchenorganen.

Die Organe wurden 1 mal mit NaCl-Lösung gewaschen; das Gehirn, die Leber und Milz mit je 2 ccm, das Knochenmark mit 1 ccm und die Niere mit 3 ccm von unverdünntem Extrakt 1^h bei 48^0 C behandelt.

Menge des Rinderserums	Mit Gehirn behand. Extrakt 0,5			Mit Knochenmark behand. Extrakt 0,5			Mit Leber behand. Extrakt 0,5			Mit Milz behand. Extrakt 0,5			Mit Niere behand. Extrakt 0,5			Unbehand. Extrakt 0,5		
	1^h bei 42^0 C	2^h bei 42^0 C	12^h b. Z. T.	1^h bei 42^0 C	2^h bei 42^0 C	12^h b. Z. T.	1^h bei 42^0 C	2^h bei 42^0 C	12^h b. Z. T.	1^h bei 42^0 C	2^h bei 42^0 C	12^h b. Z. T.	1^h bei 42^0 C	2^h bei 42^0 C	12^h b. Z. T.	1^h bei 42^0 C	2^h bei 42^0 C	12^h b. Z. T.
Rinderserum 0,5	∅	∅	leichte Flckg.	∅	∅	leichte Flckg.	∅	∅	Trübung	∅	∅	deutliche Flckg.	∅	Flckg.	Satz, trüb	Flckg.	deutliche Flckg.	Satz, klar
Rinderserum 0,2 + NaCl-Lösung 0,3	∅	∅	leichte Flckg.	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	∅	∅	Trübung	∅	∅	deutliche Flckg.	∅	Trübung	Satz, trüb	Trübung	leichte Flckg.	Satz, klar
∅ + NaCl-Lösung 0,5	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Bei dem Versuche zeigte 0,5 ccm Rinderserum mit 0,5 ccm NaCl-Lösung keine Spur von Trübung.

Aus diesen Tabellen geht hervor, daß durch die Behandlung mit Organzellen die Präcipitation des Choleraextraktes durch Immunserum vollständig aufgehoben oder stark abgeschwächt wurde. Wir können aber nicht mit Sicherheit sagen, in welchen Organen die Wirkung am stärksten ausgesprochen war. Für den nächsten Versuch haben wir Kaninchenorgane zur Untersuchung verwendet, und zwar den Choleraextrakt in unverdünntem Zustande benutzt. Die einmal gewaschenen Kaninchenorgane wurden mit Extrakt zusammen (Gehirn, Leber und Milz mit je 2 ccm, Niere mit 3 ccm, Knochenmark mit 1 ccm Extrakt vermischt) 1^h im Wasserbad bei 40° C belassen und damit der analoge Versuch ausgeführt; nur gelangte statt Immunserum normales aktives Rinderserum zur Verwendung.

Wie die Tabelle zeigt, entfalten die Organzellen eines normalen Kaninchens gegenüber den Choleraextrakten ganz dieselbe Wirkung. Hier ist aber die hemmende Wirkung der Präcipitation durch Behandlung mit Organzellen nach längerer Zeit nicht so deutlich wahrzunehmen, wie es bei den vorangehenden Versuchen der Fall war.

B. Mikroskopische Untersuchung auf Bakteriolysine, bactericide Plattenversuche und Tierversuche.

Im vorigen Kapitel haben wir darauf hingewiesen, daß die Organzellen eines Meerschweinchens und auch Kaninchens auf die Präcipitation eines Choleraextraktes einen gewissen hemmenden Einfluß auszuüben vermögen. Doch war diese Wirkung nicht ganz eklatant. Wir wissen ja, daß durch Behandlung mit Bakterienextrakt infolge Komplementbindung eine Abschwächung oder Vernichtung der Serumbactericidie zustande kommt. Wir haben einige Versuche angestellt, um zu untersuchen, wie sich der mit Organzellen behandelte Bakterienextrakt in dieser Hinsicht verhält. Zu dem Zwecke wurde die Bakteriolyse der Choleravibrionen durch Rinderserum geprüft. Hauptsächlich haben wir die mikroskopische Untersuchung ausgeführt, und zwar aus dem Grunde, weil mit dieser Methode ein stets einwandfreies Resultat zu erzielen ist, und weil ferner feinere Differenzen, welche bei dem bactericiden Plattenversuche nicht zum Ausdruck kommen, deutlich zutage treten. Durch die ausführlichen Untersuchungen von Bail und Tsuda (Versuche üb. bakteriolyt. Immunkörper mit besond. Berücksichtigung d. normal. Rinderserums. Zeitschr. f. Imm.-Forsch. usw. 1, H. 4, 1909) wurde festgestellt, daß 0,05 ccm frisches aktives Rinderserum bei geeigneter Temperatur $^1/_{10}$ Öse Choleravibrionen (Stamm Chol. Pfeiffer) regelmäßig vollständig in Granula umwandelt. Wir haben also dasselbe Mengenverhältnis zu unseren Versuchen gewählt und ebenfalls mit dem Stamm Chol. Pfeiffer gearbeitet.

Versuch 4.

Mit Meerschweinchenorganen.

Die Organe wurden 3mal mit NaCl-Lösung gewaschen; das Gehirn und die Leber mit je 1 ccm, die Milz und Niere mit je 0,8 ccm, die Leukocyten, Lunge und das Knochenmark mit je 0,7 ccm von unverdünntem Extrakte $1^1/_2$ Stunde bei 37° C behandelt. Nach der Abzentrifugierung und Verteilung des Extraktes wurden zu jedem Röhrchen je 0,05 ccm aktives Rinderserum und ca. $^1/_{10}$ Öse Choleravibrionen zugesetzt. Nach 1stündigem Aufenthalt bei 42° C wurden die mikroskopischen Präparate angefertigt. In der Tabelle bedeutet + eine schwache, ++ eine mittelstarke, +++ sehr starke Granulabildung und — das Ausbleiben der Vibriolyse.

1.	Mit Gehirn behand. Extrakt . . .	0,1	+
2.	do. . . .	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	+
3.	„ Knochenmark behand. Extrakt	0,1	+
4.	do.	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	+
5.	„ Leber behand. Extrakt . . .	0,1	+++
6.	do. . . .	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	+++
7.	„ Leukocyten behand. Extrakt .	0,1	+++
8.	do. .	0,05 + NaCl-Eösung 0,05	+++
9.	„ Lunge behand. Extrakt . . .	0,1	+
10.	do. . . .	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	++
11.	„ Milz behand. Extrakt	0,1	+++
12.	do.	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	+++
13.	„ Niere behand. Extrakt . . .	0,1	++
14.	do. . . .	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	++
15.	Unbehand. Extrakt	0,1	———
16.	do.	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	———
17.	0,05 Rinderserum	+ NaCl-Lösung 0,1	+++
18.	0,15 NaCl-Lösung		———

Versuch 5.

Mit Meerschweinchenorganen.

Die Organe wurden 3mal mit NaCl-Lösung gewaschen; das Gehirn und die Leber mit je 1 ccm, die Niere mit 0,8 ccm, die Milz, Lunge und das Knochenmark mit je 0,6 ccm von unverdünntem Extrakte 2 Stunden bei 37° C behandelt. Sonst wurde der Versuch genau wie bei dem vorigen ausgeführt.

1.	Mit Gehirn behand. Extrakt . . .	0,1	+
2.	do. . . .	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	+
3.	„ Knochenmark behand. Extrakt	0,1	+
4.	do.	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	++
5.	„ Leber behand. Extrakt . . .	0,1	+++
6.	do. . . .	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	+++

7.	Mit Lunge behand. Extrakt . . .	0,1	+
8.	do. . . .	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	+
9.	„ Milz behand. Extrakt	0,1	+
10.	do.	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	+
11.	„ Niere behand. Extrakt . . .	0,1	+
12.	do. . . .	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	+ +
13.	Unbehand. Extrakt	0,1	— — —
14.	do.	0,05 + NaCl-Lösung 0,05	— —
15.		0,05 Rinderserum + NaCl-Lösung 1,0	+ + +
16.		0,15 NaCl-Lösung	— — —

Dieselben Versuche haben wir in gleicher Weise ungefähr 15mal angestellt, davon einige mit Kaninchenorganen, und haben stets dieselben Resultate erzielt. Die Kaninchenorgane wirkten aber schwächer als die des Meerschweinchens. Bei der mikroskopischen Untersuchung haben wir uns oft überzeugt, daß die agglutinierende Wirkung des Rinderserums gegenüber Choleravibrionen in mit Organzellen behandelten Extrakten manchmal vollkommen erhalten blieb, während dieselbe in unbehandelten Extrakten mehr oder minder stark abgeschwächt war. Diese Erscheinung konnte man makroskopisch nicht deutlich nachweisen. Aber bei mikroskopischer Untersuchung ließ es sich dadurch entscheiden, daß die Vibrionen im unbehandelten Extrakt-Rinderserumgemisch stets überall gleichmäßig im Präparate zerstreut waren, andererseits aber die im behandelten Extrakt-Rinderserumgemisch in Granula umgewandelten Vibrionen meist im Haufen lagen, d. h. eine starke Agglutination zeigten.

Die oben mitgeteilten Versuche beweisen, daß der mit Organzellen behandelte Choleraextrakt in seiner bakteriolyse- und agglutinationshemmenden Wirkung gegenüber Choleravibrionen durch die Behandlung mit Organzellen eine starke Einbuße erlitten hat. Diese Organzellenwirkung ist aber je nach den Organen eines Tieres und nach den Tierarten eine verschiedene. Aus unseren zahlreichen Untersuchungen schien uns die Annahme gerechtfertigt, daß die Leber und die Leukocyten am stärksten die Fähigkeit besitzen, Choleravibrionenextrakt unwirksam zu machen.

Weiter haben wir untersucht, ob die Organzellenwirkung durch höhere Temperatur beeinflußt wird.

Aus diesem Grunde wurden die 3mal mit NaCl-Lösung gewaschenen Leber-, Niere- und Leukocytenemulsionen eines Meerschweinchens 40 Minuten auf 60 bis 65° C erhitzt, dann Extrakt zugesetzt und auf die gewöhnliche Weise untersucht. Dabei wurden auch unerhitzte Organe als Kontrolle untersucht. Das Resultat zeigte ein ganz analoges Verhalten wie bei Versuch 4 und 5. Die angewandte Temperatur hat keinen Einfluß auf die Wirkung der Organzellen ausgeübt.

Unseren Versuchen (Versuch 4 u. 5) gegenüber könnte der Einwand gemacht werden, daß die Organzellen überhaupt nicht auf den Extrakt gewirkt haben, sondern daß dieselben an und für sich bactericide Stoffe gegen Choleravibrionen enthalten, welche durch den Extrakt aus den Zellen herausgelöst wurden und die Granulabildung veranlaßt haben. Nun ist aber von vielen Autoren festgestellt worden, daß eine keimtötende Wirkung in Organzellen überhaupt nicht vorhanden ist. So z. B. hat man schon nachgewiesen, daß die Keime in Organzellenemulsion in vitro nicht nur nicht abgetötet werden, sondern nach einiger Zeit ein starkes Wachstum aufweisen (bei Milzbrand von Bail und Pettersson, bei Cholera von Hoke). Die genannten Autoren haben diese Tatsache immer in bactericiden Plattenversuchen nachgewiesen. Es ist aber möglich, daß das Verhalten bei unseren mikroskopischen Untersuchungen anders wäre als bei den bactericiden Plattenversuchen der genannten Autoren, denn die Granulabildung bedeutet nicht immer eine Abtötung der Keime. Um uns vor dem oben erwähnten Einwande zu schützen, haben wir beifolgenden Versuch angestellt.

Versuch 6.

Die Leber und Niere eines Meerschweinchens wurden 3mal mit NaCl-Lösung gewaschen und die erhaltene Zellemulsion in zwei gleiche Teile geteilt. Die eine Hälfte der Leber wurde in 2 ccm Extrakt und die andere Hälfte in die gleiche Menge NaCl-Lösung, die beiden Hälften der Niere ebenfalls in je 1,5 ccm Extrakt und NaCl-Lösung aufgeschwemmt und $1^1/_2$ Stunden bei 37° C behandelt. Darauf wurden, wie die Tabelle zeigt, das inaktive Rinderserum und Komplement zugesetzt. Nachdem sämtliche Röhrchen mit NaCl-Lösung bis 0,5 ccm aufgefüllt waren, wurden überall $^1/_{10}$ Öse Vibrionen hinzugefügt und nach 1stündigem Aufenthalt bei 42° C die Präparate angefertigt.

1.	Mit Leber beh. Extrakt	0,2 +	inakt. R.-S. 0,05 +	Kompl. 0,025	+ +
2.	do.	0,2 +	do. +	do.	+ +
3.	do.	0,1 +	do. +	∅	— — —
4.	do.	0,2 +	∅ +	do.	— — —
5.	„ Niere beh. Extrakt	0,2 +	do. +	do.	+ +
6.	do.	0,1 +	do. +	do.	+ +
7.	do.	0,2 +	do. +	∅	— — —
8.	do.	0,2 +	∅ +	do.	— — —
9.	„ Leb. beh. NaCl-Lös.	0,2 +	do. +	do.	+ + +
10.	do.	0,1 +	do. +	do.	+ + +
11.	do.	0,2 +	do. +	∅	— — —
12.	do.	0,2 +	∅ +	do.	— — —
13.	„ Niere beh. NaCl-Lös.	0,2 +	do. +	do.	+ + +
14.	do.	0,1 +	do. +	do.	+ + +
15.	do.	0,2 +	do. +	∅	— — —
16.	do.	0,2 +	∅ +	do.	— — —

17.	Unbehand. Extrakt	0,2 +	inakt. R.-S. 0,05	+	Kompl. 0,025	— — —
18.	do.	0,1 +	do.	+	do.	— — —
19.	∅	+	do.	+	do.	+ + +
20.	∅	+	do.	+	∅	— — —
21.	∅	+	∅	+	do.	— — —
22.	0,5 NaCl-Lösung					— — —

Dieser Versuch beweist, daß bei der Behandlung des Extraktes sowie der NaCl-Lösung mit Organzellen eine bakteriolytisch wirkende Substanz gegenüber Choleravibrionen überhaupt nicht in die Flüssigkeit übergeht. Man kann also den Schluß ziehen, daß die von uns bei mikroskopischer Untersuchung festgestellte Tatsache nicht auf Organzellenwirkung gegenüber Choleravibrionen, sondern auf eine Wirkung auf den Choleraextrakt zurückzuführen ist, derart, daß die Hemmung der Serumbactericidie durch Extrakt beeinträchtigt ist.

Obzwar die bactericiden Plattenversuche, wie wir schon betont haben, nicht geeignet sind, eine feinere Differenz zum Ausdruck zu bringen, so haben wir doch einige derartige Versuche angestellt. Das Resultat war folgendes:

Versuch 7.

Mit Meerschweinchenorganen.

Die Organe wurden 3 mal mit NaCl-Lösung gewaschen; das Knochenmark, die Milz und Lunge mit je 0,6 ccm, die Leber und das Gehirn mit je 1 ccm, die Niere mit 0,8 ccm von unverdünntem Choleraextrakte 2 Stunden bei 37° C behandelt, 0,2 ccm von jeder Flüssigkeit zur Untersuchung verwendet. Zu jedem Röhrchen wurde 0,1 ccm aktives Rinderserum hinzugesetzt, hierauf mit NaCl-Lösung bis 1 ccm aufgefüllt und die Platten nach 4stündigem Aufenthalt bei 37° C gegossen.

1.	Mit Gehirn behand. Extrakt . . .	40 000
2.	„ Knochenmark behand. Extrakt	20 000
3.	„ Leber behand. Extrakt	280
4.	„ Lunge „ „	600 000
5.	„ Milz „ „	50 400
6.	„ Niere „ „	600 000
7.	Unbehand. Extrakt	1 000 000
8.	0,1 Rinderserum allein	100
9.	0,1 NaCl-Lösung allein	∞
	Einsaat	600 000

Versuch 8.

Mit Meerschweinchenorganen.

Der Versuch wurde in gleicher Weise wie der vorhergehende angestellt. Die Leber und das Gehirn mit je 1 ccm, die Milz und Niere mit je 0,8 ccm, die Lunge, Leukocyten und das Knochenmark mit je 0,7 ccm von unverdünntem Extrakte $1^1/_2$ Stunde bei 37° C behandelt.

1.	Mit Gehirn behand. Extrakt . . .	8 400
2.	„ Knochenmark behand. Extrakt	8 000
3.	„ Leber behand. Extrakt	376
4.	„ Leukocyten behand. Extrakt .	192
5.	„ Lunge behand. Extrakt	14 000
6.	„ Milz „ „	1 800
7.	„ Niere „ „	2 400
8.	Unbehand. Extrakt	144 000
9.	0,1 Rinderserum allein	Steril
10.	0,1 NaCl-Lösung allein	∞
	Einsaat	500 000

Diesen Versuchen entnimmt man, daß die Organzellen befähigt sind, die hemmende Wirkung der Serumbactericidie eines Choleraextraktes abzuschwächen, was man auch im bactericiden Plattenversuche zeigen kann.

Auch im Tierversuche wollten wir den analogen Nachweis erbringen.

Versuch 9.

Die Leber eines Meerschweinchens wurde 3mal mit NaCl-Lösung gewaschen und mit 5 ccm Extrakt $1^1/_2$ Stunde bei 42° C behandelt.

Meerschweinchen Nr. 1. 220 g schwer (Versuchstier). Intraperitoneale Injektion von 1,5 ccm behandeltem Extrakte mit 0,005 ccm Choleraimmunserum; nach $^1/_4$ Stunde Injektion von 1 Öse Choleravibrionen.

Sofort: Unmassen von Vibrionen.
Nach 10 Minuten: Vibrionen vermindert, ziemlich viele Granula.
Nach 20 Minuten: Mehr Granula als Vibrionen.
Nach 30 Minuten: Meistens Granula, nur vereinzelte Vibrionen.
Nach 12 Stunden: Ganz munter. Massenhafte Leukocyten, keine freie Vibrionen, nur vereinzelte Granula in Leukocyten.

Meerschweinchen Nr. 2. 220 g schwer (Kontrolltier). Intraperitoneale Injektion von 1,5 ccm unbehandeltem Extrakte mit 0,005 ccm Choleraimmunserum; nach $^1/_4$ Stunde Injektion von 1 Öse Choleravibrionen.

Sofort: Unmassen von Vibrionen.
Nach 10 Minuten: Vibrionen vermindert, ziemlich viele Granula.
Nach 20 Minuten: Granula und Vibrionen ungefähr gleich viel.
Nach 30 Minuten: Der Befund ungefähr gleich wie bei voriger Entnahme.

Nach 12 Stunden: Tod. In Bauchhöhle einige Kubikzentimeter von klarer dünner Flüssigkeit. Im Exsudate Unmassen von Vibrionen, keine Granula, fast keine Leukocyten. Ausstrich aus dem Netze massenhafte freie Vibrionen, wenige freie Granula und ziemlich viele Makrophagen, mit Granula gefüllt.

Versuch 10.

Die Milz eines Meerschweinchens wurde 3mal mit NaCl-Lösung gewaschen und mit 1,3 ccm Extrakt $1^1/_2$ Stunde bei 37° C behandelt.

Meerschweinchen Nr. 3. 200 g schwer (Versuchstier). Intraperitoneale Injektion von 1,3 ccm behandeltem Extrakte mit 0,005 ccm Choleraimmunserum; 10 Minuten später Injektion von $1^1/_2$ Öse Choleravibrionen.

Sofort: Massenhafte Vibrionen.
Nach 10 Minuten: Vibrionen vermindert, hie und da ziemlich viele Granula.
Nach 20 Minuten: Vibrionen und Granula ungefähr gleich viel.
Nach 30 Minuten: Der Befund ungefähr gleich, wie bei der vorigen Entnahme.
Nach 1 Stunde: Mehr Granula als Vibrionen.
Nach 2 Stunden: Granula überwiegend mehr als Vibrionen.
Nach 24 Stunden: Ganz munter. Exsudat dick eitrig, massenhafte Leukocyten, nur vereinzelte freie Vibrionen, hie und da Phagocytose.

Meerschweinchen Nr. 4. 210 g schwer (Kontrolltier). Intraperitoneale Injektion von 1,3 ccm unbehandeltem Extrakte mit 0,005 ccm Choleraimmunserum; 10 Minuten später Injektion von $1^1/_2$ Öse Choleravibrionen.

Sofort: Massenhafte Vibrionen.
Nach 10 Minuten: Vibrionen vermindert, wenige Granula.
Nach 20 Minuten: Mehr Vibrionen als Granula.
Nach 30 Minuten: Der Befund ungefähr gleich, wie bei der vorigen Entnahme.
Nach 1 Stunde: Vibrionen sehr viel, Granula etwas weniger.
Nach 2 Stunden: Vibrionen äußerst reichlich, Granula nur hie und da sichtbar.
Nach 20 Stunden: Das Tier tot aufgefunden. Leichte Eiterbeläge auf der Leberoberfläche. Exsudat ca. 3 cm^3, dünnflüssig, ziemlich viele Vibrionen, vereinzelte Granula, hie und da Leukocyten mit Phagocytose.

Dieselben Versuche wurden wiederholt ausgeführt, indem einmal der Extrakt mit Meerschweinchengehirn, das andere Mal mit Meerschweinchenleber, das dritte Mal mit Meerschweinchenniere behandelt wurde. Diese 3 Versuche verliefen aber fast resultatlos, indem die mit dem behandeltem injizierten Tiere ebenso wie die Kontrolltiere, wenn

auch mit einigem Unterschied in der Lebensdauer und den Sektionsbefunden, starben. Das Versuchstier ist entweder mit steriler Bauchhöhle oder mit wenigen Vibrionen und reichlichen Leukocyten in der Bauchhöhlenflüssigkeit zugrunde gegangen, während die Kontrolltiere stets reichliche Vibrionenmenge in derselben aufwiesen.

Obwohl wir bei den Tierversuchen nicht immer das gewünschte Resultat erzielen konnten, so nahmen wir doch an, daß die Wirkung der Komplementausschaltung des Extraktes im Tierkörper durch Organzellenbehandlung in gewissem Grade beeinträchtigt wurde. Dies ist aber sowohl wegen der Individualität der Tiere einerseits, andererseits aber wegen der Giftigkeit des Extraktes schwer mit Sicherheit festzustellen. Jedenfalls ist der Tierversuch zu grob, um den feineren Unterschied zwischen unbehandelten und mit Organzellen behandelten Extrakten jedesmal deutlich zum Ausdruck zu bringen.

C. Komplementbindungsversuche.

Wir haben anläßlich einer früheren Untersuchung (Toyosumi, Centralbl. f. Bakt. usw., Orig.-Bd. 48, Heft 3, 1908) den Mechanismus der Komplementabsorption ziemlich genau studiert und dabei die Meinung ausgesprochen, daß die zur Komplementbindung befähigten Komponenten höchst wahrscheinlich im Präcipitate vorhanden sind. Wenn die Tatsache, welche wir schon nachgewiesen haben (diese Arbeit, Abschnitt A), daß nämlich die präcipitierende Wirkung des Choleraextraktes durch Behandlung mit Organzellen aufgehoben oder abgeschwächt wird, richtig ist, so müßte auch seine komplementbindende Fähigkeit durch Organzellenbehandlung verloren gegangen sein. Die zu diesem Nachweis angestellten Versuche ergaben folgendes Resultat:

Versuch 11.

Die Organe eines Meerschweinchens wurden 3mal mit NaCl-Lösung gewaschen. Das Gehirn, die Leber und Niere wurden mit je 1 ccm, das Knochenmark, die Lunge, Milz und Leukocyten mit je 0,6 ccm von 2fach verdünntem Extrakt $1^1/_2$ h bei 37° C behandelt. Nach der Verteilung des Extraktes wurden 0,05 ccm Choleraimmunserum und 0,1 ccm Komplement zugesetzt.

Als hämolytisches System wurden die mit 2fach lösender Dosis des hämolytischen Amboceptores sensibilisierten 5%igen Hammelblutkörperchen verwendet. In dem Falle bedeutet ∅ eine komplette Hemmung.

1.	Mit Gehirn behand. Extrakt	0,15 +	Im.-S. 0,05		∅
2.	do.	0,1 +	do.		∅
3.	do.	0,05 +	do.		fast kompl. Lösung
4.	do.	0,02 +	do.		kompl. Lösung

5.	Mit Gehirn behand. Extrakt	0,01 +	Im.-S.	kompl. Lösung
6.	do.	0,15 +	∅	do.
7.	„ Knochenmark beh. Extr.	0,15 +	Im.-S. 0,05	∅
8.	do.	0,1 +	do.	∅
9.	do.	0,05 +	do.	starke Hemmung
10.	do.	0,15 +	∅	kompl. Lösung
11.	„ Leber behand. Extrakt	0,15 +	Im.-S. 0,05	starke Lösung
12.	do.	0,1 +	do.	kompl. Lösung
13.	do.	0,05 +	do.	do.
14.	do.	0,02 +	do.	do.
15.	do.	0,01 +	do.	do.
16.	do.	0,15 +	∅	do.
17.	„ Leukocyten beh. Extr.	0,15 +	Im.-S. 0,05	fast kompl. Lösung
18.	do.	0,1 +	do.	kompl. Lösung
19.	do.	0,05 +	do.	do.
20.	do.	0,15 +	∅	do.
21.	„ Lunge behand. Extrakt	0,15 +	Im.-S. 0,05	∅
22.	do.	0,1 +	do.	∅
23.	do.	0,05 +	do.	∅
24.	do.	0,15 +	∅	kompl. Lösung
25.	„ Milz behand. Extrakt	0,15 +	Im.-S. 0,05	∅
26.	do.	0,1 +	do.	∅
27.	do.	0,05 +	do.	starke Hemmung
28.	do.	0,15 +	∅	kompl. Lösung
29.	„ Niere behand. Extrakt	0,15 +	Im.-S. 0,05	∅
30.	do.	0,1 +	do.	∅
31.	do.	0,05 +	do.	starke Hemmung
32.	do.	0,02 +	do.	kompl. Lösung
33.	do.	0,01 +	do.	do.
34.	do.	0,15 +	∅	do.
35.	unbehand. Extrakt	0,15 +	Im.-S. 0,05	∅
36.	do.	0,1 +	do.	∅
37.	do.	0,05 +	do.	∅
38.	do.	0,02 +	do.	starke Hemmung
39.	do.	0,01 +	do.	fast kompl. Lösung
40.	do.	0,15 +	∅	kompl. Lösung
41.		∅ +	Im.-S. 0,05	do.
42.	0,1 Komplement allein			do.

Versuch 12.

Die Organe eines Meerschweinchens wurden 3mal gewaschen. Die Niere, Leber und das Gehirn wurden mit je 1 ccm, sonstige Organe mit je 0,8 ccm von 2fach verdünntem Extrakte $1^1/_2{}^h$ bei 37° C behandelt. Sonstige Versuchsanordnungen wurden wie bei dem vorigen Versuche ausgeführt.

1.	Mit Gehirn behand. Extrakt	0,1	+	Im.-S. 0,05	∅
2.	do.	0,05	+	do.	fast kompl. Lösung
3.	do.	0,025	+	do.	kompl. Lösung
4.	do.	0,01	+	do.	do.
5.	do.	0,05	+	do.	do.
6.	do.	0,1	+	∅	do.
7.	„ Knochenmark beh. Extr.	0,1	+	Im.-S. 0,05	∅
8.	do.	0,05	+	do.	kompl. Lösung
9.	do.	0,1	+	∅	do.
10.	„ Leber behand. Extrakt	0,1	+	Im.-S. 0,05	∅
11.	do.	0,05	+	do.	kompl. Lösung
12.	do.	0,025	+	do.	do.
13.	do.	0,01	+	do.	do.
14.	do.	0,005	+	do.	do.
15.	do.	0,1	+	∅	do.
16.	„ Leukocyten beh. Extr.	0,1	+	Im.-S. 0,05	starke Hemmung
17.	do.	0,05	+	do.	kompl. Lösung
18.	do.	0,025	+	do.	do.
19.	do.	0,01	+	do.	do.
20.	do.	0,1	+	∅	do.
21.	„ Lunge behand. Extr.	0,1	+	Im-S. 0,05	∅
22.	do.	0,05	+	do.	∅
23.	do.	0,025	+	do.	kompl. Lösung
24.	do.	0,01	+	do.	do.
25.	do.	0,05	+	do.	do.
26.	do,	0,1	+	∅	do.
27.	„ Milz behand. Extrakt	0,1	+	Im-S. 0,05	∅
28.	do.	0,05	+	do.	kompl. Lösung
29.	do.	0,01	+	do.	do.
30.	do.	0,1	+	∅	do.
31.	„ Niere behand. Extrakt	0,1	+	Im-S. 0,05	∅
32.	do.	0,05	+	do.	starke Hemmung
33.	do.	0,025	+	do.	starke Lösung
34.	do.	0,01	+	do.	kompl. Lösung
35.	do.	0,005	+	do.	do.
36.	do.	0,1	+	∅	do.
37.	unbehand. Extrakt	0,1	+	Im.-S. 0,05	∅
38.	do.	0,05	+	do.	∅
39.	do.	0,025	+	do.	∅
40.	do.	0,01	+	do.	kompl. Lösung
41.	do.	0,005	+	do.	do.
42.	do.	0,1	+	∅	do.
43.		∅	+	Im.-S. 0,05	do.
44.	0,1 Komplement allein				do.

Die mehrmals in gleicher Anordnung wie die vorliegenden Versuche angestellten Versuche zeigten vollkommen überein-

stimmende Resultate. In den oben mitgeteilten Tabellen, sowie in den übrigen Versuchen, die wir hier nicht wiedergeben, haben wir festgestellt, daß durch Behandlung mit Organzellen der Extrakt seine komplementbindende Fähigkeit vollständig oder teilweise verliert. Hierbei wirkten die Leber und die Leukocyten am stärksten, die übrigen Organzellen mehr oder weniger schwächer. Weiter wurde untersucht, ob durch Erhitzung diese Organzellenwirkung zerstört wurde. Die Leber, Niere und Leukocyten eines Meerschweinchens wurden in möglichst wasserfreiem Zustande $^1/_2{}^h$ auf 60 bis 63° erhitzt, darauf der Extrakt hinzugesetzt und in der gewöhnlichen Weise untersucht. Dabei fand man fast keine Differenz zwischen erhitzten und unerhitzten Organzellen. Nur in einigen Fällen bemerkte man eine leichte Abschwächung bei den Leukocyten; allerdings war der Unterschied nicht sehr eklatant.

Ferner haben wir, um dem bereits früher erwähnten Einwand zu begegnen, untersucht, ob sich in gewaschenen Meerschweinchenorganzellen entweder komplementartig wirkende Substanzen oder hämolytische Amboceptoren vorfinden, wodurch dann die komplementbindende Wirkung des Choleraextraktes verdeckt würde. Zu dem Zwecke haben wir folgenden Versuch angestellt. Wir haben einerseits dem mit Organzellen behandelten Extrakte die mit der 5fach lösenden Amboceptordosis sensibilisierten Hammelblutkörperchen und andererseits 0,1 ccm Meerschweinchenserum mit nicht sensibilisierten Hammelblutkörperchen hinzugesetzt.

Versuch 13.

Die Leber und Niere eines Meerschweinchens wurden 3mal mit NaCl-Lösung gewaschen, einerseits mit je 1 ccm Extrakt, andererseits mit je 1 ccm NaCl-Lösung $1^1/_2{}^h$ bei 37° C behandelt.

1. Mit Leber behand. Extrakt 0,2 + 5fach sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — Keine Hämol.
2. „ Leber behand. Extrakt 0,1 + 5fach sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
3. „ Leber behand. Extrakt 0,2 + ∅ + Kompl. 0,1 + nicht sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
4. „ Leber behand. Extrakt 0,1 + ∅ + Kompl. 0,1 + nicht sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
5. „ Niere behand. Extrakt 0,2 + 5fach sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
6. „ Niere behand. Extrakt 0,1 + 5fach sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „

7. „ Niere behand. Extrakt 0,2 + ∅ + Kompl. 0,1 + nicht sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — Keine Hämol.
8. „ Niere behand. Extrakt 0,1 + ∅ + Kompl. 0,1 + nicht sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
9. „ Leber behand. NaCl-Lösung 0,2 + 5fach sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
10. „ Leber behand. NaCl-Lösung 0,1 + 5fach sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
11. „ Leber behand. NaCl-Lösung 0,2 + ∅ + Kompl. 0,1 + nicht sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
12. „ Leber behand. NaCl-Lösung 0,1 + ∅ + Kompl. 0,1 + nicht sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
13. „ Niere behand. NaCl-Lösung 0,2 + 5fach sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
14. „ Niere behand. NaCl-Lösung 0,1 + 5fach sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
15. „ Niere behand. NaCl-Lösung 0,2 + ∅ + Kompl. 0,1 + nicht sensibl. Hammelbl.-K. 1,0 — „
16. „ Niere behand. NaCl-Lösung 0,1 + ∅ + Kompl. 0,1 + nicht sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
17. Kompl. 0,1 + nicht sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — „
18. Kompl. 0,1 + 5fach sensib. Hammelbl.-K. 1,0 — kompl. Lösg.

Der Versuch beweist ganz klar, daß die 3mal gewaschenen Organzellen eines Meerschweinchens weder Spuren von Komplementen, noch hämolytischen Amboceptor enthalten, noch abgeben. Aus diesem Versuche kann man mit Sicherheit schließen, daß die Organzellen direkt auf den Extrakt wirken, so daß die komplementbindende Kraft des letzteren stark beeinträchtigt wird.

Wenn wir das Resultat unserer Versuche überblicken, so läßt sich so viel mit Sicherheit sagen, daß der Choleraextrakt durch Behandlung mit Organzellen seine Wirkung eingebüßt hat. Dieselbe besteht darin, daß der Choleraextrakt mit spezifischem Immunserum zusammen ausgeflockt wird und die Fähigkeit erlangt, Komplement zu binden. Beide Wirkungen gehen verloren oder werden stark abgeschwächt. In unseren früheren Untersuchungen haben wir jedoch gezeigt, daß die Immunkörper des Serums, solange sie im Serum gelöst vorhanden sind, nicht den Extrakt durch Bindung unwirksam zu machen imstande sind, dieselben besitzen im Gegenteil, wie wir ebenfalls nachweisen konnten, die Fähigkeit, ohne eine merkliche Verbindung mit demselben einzugehen, ihn derart zu verändern, daß er Komplement absorbiert (Centralbl. f. Bakt. usw., 48, Heft 3, S. 328, Versuch 6, 7, 8). Nur wenn eine sichtbare Präcipitation eintritt, so ist nach Entfernung des Präcipitates der

überstehende Extrakt wirkungslos. Hier liegen ähnliche Verhältnisse vor, denn der Endeffekt durch Behandlung mit Zellen ist derselbe, indem auch hierbei der Extrakt seine Funktion verliert.

Für die Erklärung dieses Phänomens kämen nun zwei Umstände in Betracht. So könnten auf rein mechanischem Wege und in nicht spezifischer Weise durch Behandlung mit Zellen die wirksamen Extraktbestandteile ausgefällt werden, was dann zu demselben Effekte führen würde, wie wenn durch spezifisches Immunserum Präcipitation hervorgerufen würde. In Übereinstimmung mit den Anschauungen Ehrlichs könnte man sich aber auch vorstellen, daß bei der von uns beschriebenen Erscheinung die an den Zellen fixierten Receptoren mit ihrer haptophoren (präcipitierenden) Gruppe die präcipitinogene Substanz des Extraktes unwirksam gemacht hätten. Mit dieser Anschauung stünden auch die erwähnten Versuche von Weil und Braun nicht im Widerspruch, denn in diesen hatte es sich darum gehandelt, die hypothetischen Zellreceptoren von den Zellen loszulösen, was aber nicht gelungen ist. Dieser Umstand spielt aber bei der von uns gegebenen Erklärung keine Rolle. Welcher von den beiden von uns angeführten Erklärungsversuchen richtig ist, muß weiteren Untersuchungen, die wir noch auszuführen gedenken, vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung.

1. Die Organzellen des normalen Meerschweinchens besitzen die Fähigkeit, Choleraextrakt unwirksam zu machen, und zwar in der Weise, daß er sowohl seine Fällbarkeit als auch seine komplementbildenden Eigenschaften verliert.

2. Diese Fähigkeit ist in Meerschweinchenorganen stärker vorhanden als in denen des normalen Kaninchens.

3. Diese Wirkung scheint in den Leukocyten und der Leber am stärksten, in den übrigen Organen (Niere, Milz, Lunge, Gehirn und Knochenmark) schwächer zum Ausdruck zu kommen.

4. Ob es sich hierbei um eine nicht spezifische Ausfällung des Extraktes handelt, oder um den Einfluß von Zellreceptoren im Sinne P. Ehrlichs, kann auf Grund unserer Versuche nicht entschieden werden.

Die Durchlässigkeit der Zellen für Farbstoffe.

Von

Rudolf Höber.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Kiel.)

(Eingegangen am 1. Juli 1909.)

Eine der Grundfragen der Physiologie ist die Frage nach dem Mechanismus der Stoffaufnahme. Deshalb hat auch diejenige Theorie, welche zum erstenmal die Aufnahme von Hunderten chemischer Verbindungen als einen gut definierten, einfachen physikalisch-chemischen Vorgang hinstellte, die Lipoidtheorie von Overton, seit ihrer Aufstellung mehr und mehr von sich reden gemacht; ich selbst bin von vornherein ihr eifrigster Vorkämpfer gewesen.

Die Theorie ist nun in der letzten Zeit mehrfach auf lebhaften Widerspruch gestoßen, sowohl auf Grund allgemeiner Betrachtungen über das Wesen der Stoffaufnahme, als auch auf Grund neuer experimenteller Befunde. Da beide Kategorien von Einsprachen zum Teil direkt gegen mich als einen der Hauptvertreter der Theorie, sowie gegen meine weitere Fortbildung derselben gerichtet sind, so sehe ich mich veranlaßt, von neuem zur Overtonschen Theorie Stellung zu nehmen.

Will man in der wichtigen Frage der Stoffaufnahme heute vorwärts kommen, so muß man sich, scheint mir, vor allem einmal darüber klar werden, wie weit Overtons Theorie hier eine Antwort gibt und wie weit nicht. Merkwürdigerweise sind manche Forscher offenbar in der Meinung an die Theorie herangetreten, daß dies Rätsel der Stoffaufnahme von Overton gelöst wird. Aber gerade dies ist ganz und gar nicht der Fall; vielmehr werden wir von Overton gerade erst darauf hingewiesen, wie rätselhaft der Vorgang ist. Overton hat auf

Grund seiner Experimente den Satz aufgestellt, daß die Verbindungen, welche in den Lipoiden löslich sind, durch einen einfachen diosmotischen Vorgang in alle Zellen — tierische sowohl wie pflanzliche — eindringen, und zwar mit einer Geschwindigkeit, welche der relativen Löslichkeit in der aus Lipoiden aufgebauten Plasmahaut parallel geht, während die Verbindungen, welche lipoidunlöslich sind, nicht oder höchstens sehr schwer auf dem einfachen diosmotischen Wege ins Zellinnere gelangen können. Sieht man nun zu, welche chemischen Verbindungen lipoidlöslich und welche lipoidunlöslich sind, so findet man, daß die meisten Verbindungen, welche im gewöhnlichen Leben der Zelle eine Rolle spielen, lipoidunlöslich sind, und daß nur oder vorzugsweise solche Verbindungen sich in den Lipoiden lösen, welche im allgemeinen zellfremd sind. Daraus geht dann doch aber klipp und klar hervor, daß die physiologische Stoffaufnahme eben kein diosmotischer Vorgang ist; die physiologische Stoffaufnahme wird von der Overtonschen Theorie eben nicht erklärt, Overton beweist vielmehr gerade, daß diese Aufnahme kein einfacher diosmotischer Vorgang in einer Lipoidhaut sein kann.

Nun sagen manche: unzweifelhaft werden die lipoidunlöslichen Nahrungsstoffe von den Zellen ausgenützt, also werden sowohl lipoidlösliche wie lipoidunlösliche Verbindungen aufgenommen; woran soll man dann aber erkennen, ob die Aufnahme ein einfacher diosmotischer Vorgang oder ein anderer Prozeß ist? — Stellt man diese Frage, so dreht man sich im Kreise; verhielten sich die meisten Zellen gegenüber lipoidlöslichen und lipoidunlöslichen nicht deutlich verschieden, dann hätte Overton natürlich nie seine Theorie aufstellen können. Aber das ist ja gerade das Merkwürdige, daß mit der größten Einförmigkeit die verschiedensten Zellen, wie Pflanzenzellen, Blutkörperchen, Darmepithelien, Muskeln, Hautepithelien im diosmotischen Experiment die gleiche Durchlässigkeit für die lipoidlöslichen dokumentieren, gegenüber den lipoidunlöslichen, d. h. eventuell physiologisch höchst wertvollen Körpern sich aber meist wie undurchlässig benehmen. Die physiologische Stoffaufnahme erfolgt also offenbar nicht, wenn der Experimentator es will, wenn er die betreffenden physiologischen Stoffe in entsprechend steilen Diffusionsgefällen darbietet, sondern hängt von den Zellen

selbst ab, bzw. geht in weitaus den meisten Fällen mit anderer, geringerer Geschwindigkeit vor sich. Gewiß ist es zuzugeben, daß manchmal — z. B. bei manchen Pflanzenzellen oder bei den Nierenepithelien — die Unterscheidung zwischen der diosmotischen und der „physiologischen" Stoffaufnahme gekünstelt aussehen muß oder richtiger: gar nicht möglich ist, weil in diesem Falle die physiologische Stoffaufnahme besonders leicht auszulösen ist oder besonders schnell vor sich geht. Hier könnte man eventuell auf die Vermutung kommen, daß allen Stoffen der Umgebung Tür und Tor in die Zellen offen stehen, daß die Stoffaufnahme ein Diffusionsprozeß ist und nichts weiter. Aber diese grobe Vorstellung erweist sich in den meisten Fällen als ungenügend, und das gerade wurde von Overton gezeigt.

Übrigens sei doch auch gleich noch darauf hingewiesen, daß diese ganze Unterscheidung der Stoffaufnahme in eine rein diosmotische und eine andere „physiologische" von der eigentlichen Lipoidtheorie ganz unabhängig ist. Overton hat nämlich erstens experimentell bewiesen, daß ein Teil der chemischen Verbindungen durch einfache Diosmose in die Zellen hineingeht, der andere nicht oder kaum, und zweitens hat Overton diesen Tatsachen eine Deutung zu geben versucht, nämlich die Deutung, daß die Fähigkeit zum diosmotischen Eintritt Funktion einer Löslichkeit in Lipoiden ist. Mag man also die Lipoidhaut zugeben oder nicht, der experimentelle Befund bleibt bestehen, daß die chemischen Verbindungen entweder durch Diosmose in die Zellen gelangen oder nicht.

Wie gesagt, ist nun Overtons Theorie mehrfach widersprochen worden. Manche gelangten zu ihrem Widerspruch, weil sie mit irrtümlichen Voraussetzungen an die Theorie herantraten. Zu diesen gehört z. B. O. Cohnheim. Er hält es für den gewichtigsten „Einwand" gegen Overtons Lehre, daß nach ihr „allen physiologisch wichtigen Körpern der Eintritt in das Protoplasma gesperrt" sei.[1]) Ein so völliges Mißverstehen ist natürlich nur möglich, wenn man in der Voraussetzung befangen ist, Overton wolle beweisen, daß die Stoffaufnahme allgemein ein einfacher diosmotischer Vorgang ist.

---

[1]) Nagels Handb. d. Physiol. 2, 613.

Auch Ruhland[1]), welcher ernste experimentelle Bedenken gegen die Overtonsche Lehre vorgebracht hat, die nachher genau erörtert werden sollen, geht offensichtlich von der Annahme aus, Overton habe mit seiner Lipoidtheorie eine Erklärung für den Import aller Stoffe durch die Zellen geben wollen. Wenn er u. a. schreibt[2]): „Höber sieht sich für diese Fälle (nämlich die Speicherung lipoidunlöslicher Farben durch die Nierenepithelien) zugunsten der Overtonschen Theorie zur Annahme gezwungen, daß hier Fälle der ‚physiologischen' an Stelle der ‚physikochemischen' Permeabilität vorliegen", so ist er augenscheinlich der Meinung, daß solche Tatsachen für den Anhänger der Overtonschen Lehre doch höchst unbequeme Dinge sein müssen, für die er Hilfshypothesen ersinnen muß. Aber wie wir sahen, gehört es ja geradezu zum Inhalt der Overtonschen Lehre, daß die Stoffe entweder diosmotisch in die Zellen gehen können oder anders aufgenommen werden, daß, wie ich es kurz auszudrücken versuchte,[3]) die Zellen eine „physikalische" und eine „physiologische" Permeabilität besitzen, eine physikalische Permeabilität, die auf dem Vorhandensein der Lipoide in der Plasmahaut beruht, und eine physiologische, die auf Einrichtungen in der Zelloberfläche beruht, vermöge deren die Zellen nach Bedarf, die einen leichter, die anderen schwerer, die lipoidunlöslichen, physiologisch wichtigen Stoffe zu importieren vermögen. Über diese doppelte Form des Imports kann man, wenn man die zahlreichen Experimente von Overton und anderen über die Permeabilität betrachtet, kaum streiten.

Mit der speziellen Lokalisierung dieser zwei Importformen in der Zelloberfläche mag es freilich anders sein; indessen scheint mir doch auch das Bild, das dafür Nathansohn[4]) entworfen hat, wonach die Plasmahaut sozusagen ein Mosaik aus lipoiden Elementen und aus zu komplizierterer Tätigkeit befähigten Protoplasmaelementen darstellt, recht brauchbar zu sein und die Anfeindung, die es mehrfach erfahren hat, nicht zu

---

[1]) Jahrb. f. wissensch. Botanik 46, 1, 1908.
[2]) l. c. S. 30.
[3]) Physikalische Chemie d. Zelle u. d. Gewebe, 2. Aufl., S. 178.
[4]) Jahrb. f. wissensch. Botanik 39, 607, 1904.

verdienen. Ruhland schreibt darüber folgendes[1]): „Daß sich Höber durch die Nathansohnsche Annahme befriedigt erklärt, ist in Anbetracht seiner gesamten Ausführungen zu diesem Thema recht auffallend. Denn während er im übrigen immer in Einklang mit Overton auf Grund dessen Theorie zu erklären versucht, daß lipoidunlösliche Körper eben wegen dieser Eigenschaft nicht in die Zelle einzudringen vermögen, vergißt er, daß diese Erklärung ja durch die Nathansohnsche Modifizierung unmöglich geworden ist. Denn nach dieser bleibt logischerweise nicht nur die regulative Beeinflussung, z. B. der Aufnahme von Mineralsalzen, sondern auch das, was die Overtonsche Theorie eigentlich erklären will, nämlich die Entscheidung, ob dieser bestimmte Körper überhaupt in die Zelle aufgenommen wird oder nicht, dem unbekannten X im Plasma überlassen. Denn weshalb sollten z. B. die so überaus leicht wasserlöslichen basischen Farbstoffe stets nur durch die Fettpartikel, aber nie durch die für Wasser so leicht durchlässigen protoplasmatischen Anteile der Hautschicht passieren, genau wie die in Wasser gelösten Mineralsalze? Und weshalb sollten infolgedessen nicht auch die ebenso wasserlöslichen, wenn auch fettunlöslichen sulfosauren Farbsalze denselben Weg nehmen und so ebenfalls ins Zellinnere gelangen? Höber gelangte also auf diese Weise zu einer ganz unleugbaren petitio principii!"

Ich kann diesen Sätzen absolut nicht zustimmen. Das Nathansohnsche Bild verdeutlicht nach meiner Ansicht erstens, daß sich nach den bisherigen Erfahrungen keine Zelle gegen den Eintritt lipoidlöslicher Stoffe zu wehren vermag, mit keinen Regulationsmitteln; auf einfach diosmotischem Wege gehen die Stoffe hinein unter dem Zwange der Gesetze der Diffusion und der Verteilung; dieser Eintritt geschähe durch Nathansohns Lipoidelemente hindurch. Das Bild verdeutlicht zweitens, daß für alle übrigen Stoffe die meisten Zellen sich im Experiment so verhalten, als ob sie von einer bloß wasserdurchlässigen Haut umkleidet wären, diese Wasserdurchlässigkeit verlegt Nathansohn in die protoplasmatischen Elemente; diese sind aber weit mehr als bloße Traubesche Niederschlagsmembranen, sie können

[1]) l. c. S. 52.

— und das hängt von der Natur der Zellen, von ihrem jeweiligen Lebenszustand u. a. ab — auch Stoffe aus Overtons Gruppe der lipoidunlöslichen durch einen uns unbekannten Mechanismus importieren. Wie weit dieses Können reicht, ist heute noch nicht zu sagen; nur so viel kann man sagen, daß das Können sehr verschieden stark entwickelt ist.

Blicken wir nun zurück, so ergibt sich, daß der Weg für die weitere Forschung über die Natur der Stoffaufnahme klar vorgezeichnet ist. Wir wissen nun, daß sehr viele Verbindungen auf einfach diosmotischem Wege in die Zellen eindringen; diese „physikalische Permeabilität" hat Overton durch die Lipoidtheorie zu erklären versucht; wie weit sie Stich hält, wird nachher noch erörtert werden. Ganz unklar sind uns dagegen die Gesetze und Bedingungen der „physiologischen Permeabilität"; d. h.: wie dringen alle die Verbindungen ein, die in die meisten Zellen offensichtlich nicht auf diosmotischem Wege gelangen? Diese Seite des Problems der Stoffaufnahme ist die weit wichtigere, weil wir es hier mit der Frage der normalen Aufnahme zu tun haben.

Ich gehe nunmehr zur Besprechung von neuen Experimenten über. Zuerst soll von Versuchen über die physikalische Permeabilität die Rede sein, also von Versuchen, die zur Theorie von Overton Stellung nehmen. Danach sollen Versuche zur Frage der physiologischen Permeabilität mitgeteilt werden.

Lipoidtheorie und Vitalfärbung.

Als eine der stärksten Stützen der Lipoidtheorie gelten Overtons Versuche über die Aufnahme von Farbstoffen durch lebende Zellen.[1]) Hier glaubte Overton am klarsten zu beweisen, daß die Annahme einer Imprägnierung der Protoplasmaoberfläche mit den Lipoiden, Cholesterin, Lecithin u. a., den Tatsachen der Stoffaufnahme aufs beste gerecht wird; denn die vitalen Farben, welche selbst in Fetten, fettähnlichen Körpern oder Fettlösungsmitteln wenig oder nicht löslich sind, werden nach ihm durch Cholesterin, Lecithin, Protagon, Cerebrin in

[1]) Jahrb. f. wissensch. Botanik 34, 669, 1900.

Lösung gebracht, und umgekehrt sind nach seiner Angabe alle nicht vitalen Farben darin unlöslich.

Diese Theorie der Vitalfärbung ist neuerdings heftig bekämpft worden. Erstens hat gegen dieselbe Brailsford Robertson[1]) Front gemacht. Ich beschränke mich hier darauf, zur Charakterisierung seiner Veröffentlichung darauf hinzuweisen, daß 1. seine sämtlichen Färbungsversuche, die er gegen Overtons Theorie ausspielt, an toten Zellen mit stark alkalischen oder stark sauren Farblösungen gemacht wurden, und daß er 2. angeblich Versuche über Lipoidlöslichkeit von Farben mitteilt, wobei aber keines seiner Lösungsmittel ein Lipoid ist. Ich kann mir danach wohl eine weitere Besprechung der Robertsonschen Arbeit sparen und will nur mein Bedauern darüber äußern, daß eine solche Veröffentlichung als ernsthafter Einwand gegen Overtons Theorie in die Literatur übergehen konnte.[2])

Sodann hat Ruhland sich auf Grund zweier interessanter Experimentalstudien[3]) emphatisch gegen Overtons Lipoidtheorie ausgesprochen. Ruhland verwendete zu seinen Untersuchungen ausschließlich pflanzliche Zellen, vorwiegend Spirogyren, und hat an diesen Objekten eine große Zahl von Farben geprüft. Sein Ergebnis lautet, in völligem Widerspruch zu Overtons Angabe, daß eine Beziehung zwischen vitaler Färbbarkeit und Lipoidlöslichkeit fehlt. Nach Overton sind die Begriffe Vitalfarbe, lipoidlösliche Farbe und Farbbase (bzw. Salz einer Farbbase) für die meisten Zellen fast ausnahmlos gleichbedeutend, während auf der anderen Seite nach ihm die Säurefarbstoffe im allgemeinen mit den lipoidunlöslichen und zugleich nicht vital färbenden Farbstoffen identisch sind. Ruhland findet dagegen, daß zwar die Farbbasen meist vital färben, aber auch manchmal, wenn sie lipoidunlöslich sind, und daß die Säurefarbstoffe meist nicht vital färben, aber manchmal auch, obgleich sie lipoidlöslich sind. Seine für uns wichtigsten Angaben sind die folgenden:

1. Es gibt lipoidunlösliche Farbbasen, welche spie-

[1]) Journ. of Biolog. Chem. 4, 1, 1908.

[2]) Siehe A. Kanitz im Handb. d. Biochem. 2, 1, S. 242.

[3]) Jahrb. f. wissensch. Botanik 46, 1, 1908 und Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 26, 772, 1909.

lend leicht in die lebenden Zellen eindringen; solche sind: Malachitgrün, Thionin, Methylengrün, Bismarckbraun;

2. es gibt eine lipoidlösliche Farbbase, welche nicht eindringt: Nachtblau;

3. es gibt lipoidlösliche Sulfosäurefarbstoffe, welche nicht eindringen; solche sind: Tuchrot 3 GA, Oxaminmarron, Echtrot A und Wollviolett S;

4. es gibt auch noch andere Farbstoffe mit sauren Eigenschaften, welche nicht eindringen; nämlich: Cyanosin, Erythrosin, Rose bengale, Chromgrün, Gallein;

5. es gibt Farben, welche trotz sehr großer Lipoidlöslichkeit nur langsam eindringen; dahin gehört u. a. Rhodamin B, das, zufolge seines langsamen Eintritts, z. B. bei großer Verdünnung, bei welcher andere Farbbasen schon nach kurzer Zeit färben (1 : 1000000), keine Spur färbt.

Diese und einige andere Angaben von Ruhland wecken in der Tat schwere Bedenken gegen die Theorie von Overton. Dabei ist von Wichtigkeit, daß sich zwar ein großer Teil der Angaben auf Farben bezieht, welche in der von Overton geprüften Farbserie nicht enthalten sind, daß aber einige Farben auch schon von Overton untersucht wurden, jedoch mit anderem Ergebnis, als Ruhland es mitteilt. Da ich nun beim Erscheinen der Ruhlandschen Arbeiten selbst mit Farbstudien beschäftigt war, so lag es mir natürlich besonders nahe, die Arbeiten nachzuprüfen.

Bevor ich zur Schilderung meiner Versuche übergehe, möchte ich aber auch an dieser Stelle den Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co., der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation, der Badischen Anilin- und Sodafabrik sowie den Höchster Farbwerken meinen Dank für die Bereitwilligkeit aussprechen, mit der sie mir Farbstoffe für meine Untersuchungen zur Verfügung stellten.

Die für die Nachprüfung der Lipoidtheorie verwendeten Farbmarken waren die folgenden:

Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co.: Methylgrün Krystalle I gelbl., Gallein, Chromgrün, Echtrot A, Afridolviolett, Afridolblau, Benzolblau BB, 2 B und 3 B, Azoblau, Benzopurpurin 4 B, Azofuchsin G Nextra, Benzoreinblau, Benzonitrolbraun 2 R, Benzodunkelgrün, Croceinscharlach 7 B.

Badische Anilin- und Sodafabrik: Thionin, Nachtblau, Rhodamin B, 6 G, G extra, 3 B und S, Irisamin G, Wollviolett S, Oxaminmarron, Echtrot B;

E. Merck: Methylengrün, Malachitgrün.

C. A. F. Kahlbaum: Bismarckbraun, Hofmanns Violett, Toluidinblau, Pararosanilinchlorhydrat, Safranin, Säurefuchsin, Bayrisch Blau, wasserlösliches Nigrosin, Säureviolett, Bordeaux R.

Sandoz & Co.: Cyanosin spritlösl., Rose bengale. Trisulfonblau B.

Geigy: Setopalin.

Cassella: Diaminreinblau.

Grübler: Krystallviolett, Brillantcresylblau, Methylenblau, Erythrosin. Trypanrot, wasserlösliches Anilinblau.

Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation: Tuchrot 3 GA, Columbia Echtscharlach.

Höchster Farbwerke: Naphthalingrün V, Patentblau A.

A. Die Lipoidlöslichkeit der Farbstoffe.

Bei diesem Teil meiner Untersuchung wie auch bei den folgenden habe ich mich im wesentlichen an diejenigen Farben gehalten, deren Eigenschaften nach Ruhland der Theorie von Overton widerstreiten.

Als Lipoid habe ich hauptsächlich Cholesterin verwendet, wie es auch Ruhland getan hat. Versuche mit Lecithin können, worauf Nathansohn[1]) und Ruhland wohl mit vollem Recht Gewicht legen, höchstens dann etwas beweisen, wenn das Lecithin absolut wasserfrei ist.

1. Basische Farbstoffe: Nach Overton (l. c. S. 679) sind Methylengrün, Malachitgrün, Thionin und Bismarckbraun in Benzol unlöslich, in Benzol-Cholesterin dagegen leicht löslich, und erweisen damit ihre Lipoidlöslichkeit. Ruhland dagegen findet, daß entweder die Benzol-Cholesterin-Löslichkeit gänzlich fehlt (Methylengrün), oder daß sie nicht größer ist als die Löslichkeit in reinem Benzol (Malachitgrün, Bismarckbraun, Thionin), so daß danach kein Grund zur Annahme einer Lipoidlöslichkeit dieser vier Farbbasen vorhanden ist. Gegen eine solche sprechen nach Ruhland aber besonders auch Versuche mit Terpentin-Cholesterin, weil Terpentinöl an und für sich ein viel schlechteres Lösungsmittel für Farbstoffe ist, als Benzol, hingegen Cholesterin sehr reichlich auflöst. Malachitgrün, Thionin und Methylengrün werden nun nach Ruhland weder von Terpentin noch von Terpentin-Cholesterin gelöst.

---

[1]) Jahrb. f. wissensch. Botan. 39, 607, 1904.

Bei der Nachprüfung dieser Angaben fand ich in der Hauptsache für:

Methylengrün: Terpentinöl: unlöslich; Terpentin-Cholesterin: unlöslich; Benzol-Cholesterin: unlöslich; siedendes Benzol-Cholesterin: ein wenig mit braunvioletter Farbe löslich.

Thionin: Terpentinöl: unlöslich; Terpentin-Cholesterin: unlöslich; Benzol-Cholesterin: sehr wenig löslich.

Malachitgrün: Terpentinöl: löslich; Terpentin-Cholesterin: löslich, aber nicht stärker als in Terpentin.

Bismarckbraun: Terpentinöl: ganz schwach löslich; Terpentin-Cholesterin: löslich.

Ich vermisse also wie Ruhland und im Gegensatz zu Overton die Lipoidlöslichkeit bei Methylengrün, Thionin und Malachitgrün; Bismarckbraun muß ich dagegen für lipoidlöslich halten.

Unter den übrigen von mir geprüften Farbbasen fand ich nur noch eine in Benzol-Cholesterin und Terpentin-Cholesterin ganz unlöslich: Methylgrün Krystalle I gelblich.

2. Säurefarbstoffe. Von den der Lipoidtheorie nach Ruhland widersprechenden Säurefarbstoffen hat Overton allein das Erythrosin geprüft; es wird nach ihm (l. c. S. 690) von in Wasser suspendiertem Protagon und Cerebrin nicht gespeichert. Auf Grund meiner Nachprüfung der Benzol-Cholesterin- und Terpentin-Cholesterin-Löslichkeit muß ich jedoch Ruhland recht geben, der Erythrosin deutlich lipoidlöslich findet. Dasselbe bestätige ich für: Tuchrot 3 GA, Echtrot A, Wollviolett S, Cyanosin und Rose bengale; Gallein und Chromgrün finde ich nur sehr wenig lipoidlöslich, Oxaminmarron im Gegensatz zu Ruhland ganz unlöslich.

B. Intravitale Färbung von Spirogyren.[1])

1. Versuche mit lipoidunlöslichen Farbbasen. Methylengrün, Thionin, Malachitgrün, Methylgrün Krystalle I gelblich färben die Spirogyren mit Leichtigkeit.

2. Die Farbbase Nachtblau soll nach Ruhland trotz Lipoidlöslichkeit die Spirogyren nicht färben. Ich vermag dies nicht zu bestätigen. Nachtblau färbt die Cellulose-Membran

[1]) Fluorescierenden Farbstoffen wurden die Spirogyren stets nur im Dunkeln ausgesetzt.

so stark, daß es mir nicht gelungen ist, von der Färbung der in die blaue Cellulosehaut eingeschlossenen Protoplasten etwas Sicheres festzustellen.

3. Mit folgenden lipoidlöslichen Säurefarbstoffen ist es mir wie Ruhland nicht geglückt, Spirogyren intravital zu färben: Echtrot A, Tuchrot 3 GA, Wollviolett S, Cyanosin, Erythrosin, Rose bengale und Gallein. Oft ist es möglich, wie auch Ruhland beiläufig erwähnt, ganz kleine Mengen von einem eingedrungenen Farbstoff durch starke Plasmolyse der Zellen nachzuweisen; die Zellen können zunächst vollkommen ungefärbt erscheinen, entzieht man ihnen dann aber, etwa durch in Substanz zugesetzten Salpeter, Wasser, so erscheinen nun eventuell die sich abkugelnden Zellsaft-Vakuolen deutlich gefärbt. Dieser Nachweis kleiner Farbmengen ist mir aber niemals bei den eben genannten lipoidlöslichen Säurefarbstoffen geglückt.

4. Das etwas lipoidlösliche Chromgrün finde ich, im Gegensatz zu Ruhland, vital färbend. Das Färbevermögen ist allerdings nur schwach; in Lösungen von 1 : 10000 erscheinen die Zellen nach 4 bis 7 Stunden völlig farblos, bei Plasmolyse kugeln sich dann aber zart hellblau gefärbte Vakuolen ab; in Lösungen von 1 : 4000 erscheinen innerhalb 24 Stunden blaue Gerbsäureniederschläge in den normal aussehenden Zellen.

5. Rhodamin B ist nach Ruhland insofern ein Farbstoff, welcher der Lipoidtheorie widerstreitet, als er trotz sehr großer Lipoidlöslichkeit nur schwer intravital färben soll; das soll, wie wir sahen, daraus hervorgehen, daß die Farbe in einer Lösung von 1 : 1000000 nicht färbt, während weniger lipoidlösliche Farbbasen, wie Neutralrot, bei der gleichen Verdünnung schon nach 3 bis 20 Minuten ihre Anwesenheit durch Gerbsäureniederschläge verraten. Ich habe mich von der Stichhaltigkeit dieses Einwandes gegen Overton nicht überzeugen können. Zwar habe ich auch niemals in Lösungen von 1:1000000 bei Rhodamin B Färbung feststellen können im Gegensatz zu Neutralrot; das dürfte aber daran liegen, daß Neutralrot mit Gerbsäure viel leichter fällt als Rhodamin B. Fügte ich z. B. stets 0,1 ccm einer starken, mit Soda neutralisierten Gerbsäurelösung zu 1 ccm von Farblösungen verschiedener Konzentration, so entstand ein Niederschlag bei Rhodamin B erst, wenn die

Lösung mehr als 0,4 °/₀ enthielt, während für Neutralrot der entsprechende Wert 0,004 °/₀ ist.

Ähnliches gilt, wie ich mich überzeugt habe, für andere Rhodamine, wie Rhodamin G extra, Rhodamin 3 B, Rhodamin S und Irisamin G.

So viel von meinen Versuchen mit Spirogyren.

Folgende Tatsachen stehen danach in Disharmonie mit der Lipoidtheorie:

1. Die lipoidunlöslichen Methylengrün, Thionin, Malachitgün, Methylgrün Krystalle I färben intravital;

2. die lipoidlöslichen Echtrot A, Tuchrot 3 GA, Wollviolett S, Cyanosin, Erythrosin, Rose bengale und Gallein färben nicht.

C. Intravitale Färbung der Darmepithelien vom Frosch.

Anschließend an meine früheren Versuche über die Resorption von Farbstoffen[1]) habe ich die an den Spirogyren geprüften Farben auch auf ihr Verhalten gegen die Darmepithelien vom Frosch untersucht. Das Verfahren bestand wie früher, einfach darin, daß die Farben in Substanz ins Maul gegeben, und daß dann die Frösche meist nach 24 Stunden getötet und untersucht wurden, indem das Epithel des aufgeschlitzten Darms abgeschabt und sofort, mit Ringerscher Lösung benetzt, unterm Mikroskop beobachtet wurde. Der Erfolg rechtfertigt das einfache Verfahren.

Die intravitale Färbbarkeit der Darmepithelien wurde früher mit den Farbbasen: Neutralrot, Methylenblau, Toluidinblau, Thionin, Nilblau A, Bismarckbraun, Safranin und Chrysoidin nachgewiesen; sie dokumentierte sich in der Aufspeicherung der Farben in feinen Granula, welche meist im farblosen Protoplasma und um den farblosen Kern herum gelagert sind. Genau so fand ich jetzt auch die Epithelien gefärbt nach Eingabe von Hofmanns Violett, Pararosanilinchlorhydrat, Nachtblau, Methylengrün und Methylgrün Krystalle I. Die Färbung mit dem letztgenannten Farbstoff

[1]) Pflügers Archiv 86, 199, 1901.

war allerdings nur ganz schwach. Malachitgrün läßt sich nicht prüfen, weil es die Frösche rasch tötet.

Es ist ersichtlich, daß also auch die Darmepithelien, wie die Spirogyren, intravital von den (durch gesperrten Druck markierten) lipoidunlöslichen Farbbasen gefärbt wurden. Das von Ruhland angezweifelte vitale Färbevermögen des lipoidlöslichen Nachtblau besteht den Darmepithelien gegenüber ohne alle Frage.

Von Farbbasen habe ich weiter noch geprüft: Rhodamin B, 3 B, S und 6 G, sowie Irisamin G. Sie alle sind stark lipoidlöslich und färben auch intravital, aber in einer Weise, die ich aus verschiedenen Gründen für bemerkenswert halte. Sie färben nämlich samt und sonders diffus rosa. Diese Diffusfärbung ist aber keineswegs, wie das so oft für die Diffusfärbung behauptet worden ist, der Ausdruck einer postvitalen Farbaufnahme. Bei völliger Durchfärbung sämtlicher Organe sind die Tiere so mobil wie immer; tötet man sie und stellt sofort ein Nerv-Muskelpräparat her, so zeigen sich die rosa durchgefärbten Muskeln von den rosafarbenen Nervenfasern aus normal erregbar. Diese vom gewöhnlichen Typus der intravitalen Färbung durch Granulafärbung abweichende Verteilung des Farbstoffes ist nun wohl am besten durch die Annahme zu erklären, daß den sonst die Farbenspeicherung übernehmenden Zellbestandteilen, den Granula, das Speicherungsvermögen für diese chemische Gruppe von Farben abgeht; dann kann sich die Farbe, welche sonst die Granula an sich reißen, im ganzen Zelleib verbreiten. Natürlich ist es unter diesen Umständen möglich, daß man die Färbung eher übersieht, als wenn der gesamte Farbstoff sich im Innern der Zelle an wenigen kleinen Stellen, eben den Granula, anhäuft, und ich habe ja auch schon vorher darauf hingewiesen, daß einem in ähnlicher Weise bei den Spirogyren mangels Bildung der gut sichtbaren Gerbsäureniederschläge die Rhodaminaufnahme aus stark verdünnten Lösungen entgehen kann, so daß Ruhland zu dem irrtümlichen Schluß gelangte, daß das Rhodamin besonders langsam eindringt. Gerade Ruhland warnt mich aber in seiner zweiten Mitteilung[1]) vor Schlußfolgerungen aus Versuchen mit Farb-

[1]) l. c. S. 780.

stoffen, welche nicht irgendwie lokal in den Zellen gespeichert werden. Um so wichtiger scheint mir der Nachweis, daß es sehr wohl gelingt, auch beim Fehlen speichernder Substanzen den Farbstoffeintritt zu beobachten.

Die Einverleibung der von Ruhland angegebenen lipoidlöslichen Säurefarbstoffe ergab folgendes: die Darmepithelien wurden nicht gefärbt von Echtrot A, Wollviolett S, Oxaminmarron, Chromgrün, Gallein, Erythrosin und Rose bengale; Cyanosin färbte manchmal diffus und manchmal nicht, Tuchrot 3 GA gab regelmäßig eine schwache Diffusfärbung.

Auch die folgenden Säurefarbstoffe färben die Darmepithelien nicht: Echtrot B, Afridolviolett, Diaminreinblau, Benzoblau BB, 3 B und 2 B, Azoblau, Benzopurpurin 4 B, Kolumbia-Echtscharlach, Azofuchsin GN extra, Benzoreinblau, Naphthalingrün V, Setopalin, Benzonitrolbraun 2 R, Benzodunkelgrün, Afridolblau, Trypanrot, Trisulfonblau B. Die Lipoidlöslichkeit dieser Farben habe ich nicht geprüft; die Versuche wurden zu besonderen Zwecken gemacht, die eben angeführten Resultate werde ich nachher erst verwerten.

Aus allen diesen Resorptionsversuchen ergibt sich für die Stellungnahme zur Lipoidtheorie folgendes:

1. die lipoidunlöslichen Methylengrün, Thionin und Methylgrün Krystalle I färben intravital;

2. die lipoidlöslichen Echtrot A, Wollviolett S, Oxaminmarron, Chromgrün, Gallein, Erythrosin und Rose bengale färben nicht.

D. Intravitale Färbung der roten Blutkörperchen des Feuersalamanders.

Ein drittes Objekt, an dem ich die Stichhaltigkeit der Lipoidtheorie nachgeprüft habe, sind die roten Blutkörperchen des Feuersalamanders, auf die ich durch Professor Meves aufmerksam gemacht wurde. Diese enthalten in ihrem Zelleib ein kleines rundes Granulum, von Meves als „chromatoides Kügelchen“ bezeichnet,[1]) das sich nach ihm mit Methylenblau, Neutralrot, Gentianaviolett, Methylviolett, Thionin und Toluidinblau intravital stark färbt. Ich habe seine Versuche

[1]) Anatomischer Anzeiger 26, 540, 1905.

wiederholt und auf eine größere Zahl von Farben ausgedehnt. Die Blutkörperchen wurden dabei in Ringer-Lösung eingetragen, der kleine Mengen der verschiedenen Farbstoffe zugesetzt waren; dann wurde so rasch als möglich untersucht.

Die Bilder, die man so erhält, sind außerordentlich mannigfach dadurch, daß Protoplasma, Kern, chromatoides Kügelchen und Randreifen färberisch, strukturell und zeitlich von den Farbstoffen sehr verschieden beeinflußt werden. Ich will aber von diesen Einzelheiten hier nur das erwähnen, was direkt zu unserem Thema gehört.

Ich habe keinen basischen Farbstoff gefunden, welcher die chromatoiden Kügelchen nicht färbt; allerdings geschieht das zu verschiedenen Zeiten und in verschiedener Intensität. Besonders schnell und schön färbt sich das Kügelchen mit Neutralrot, Toluidinblau, Brillantcresylblau, Neutralviolett und Methylengrün, langsam mit Krystallviolett, Thionin, Safranin und Methylgrün Krystalle I. In diesen letzteren Fällen geht der Färbung des chromatoiden Kügelchens diejenige des Kerns voran. Das beweist aber meiner Ansicht nach durchaus nicht, daß die Färbung eine postvitale ist. Auch Toluidinblau, Methylenblau, Brillantcresylblau, Bismarckbraun färben sofort den Kern; ich habe überhaupt einzig und allein beim Neutralrot beobachtet, daß die Kernfärbung erst später eintritt als diejenige des chromatoiden Kügelchens. In allen diesen Fällen bleibt das Protoplasma homogen und farblos, und der Kern hebt sich nur unscharf als hell und diffus gefärbter Körper von seiner Umgebung ab. Wenn die Zelle abgestorben ist, dann erhält man ein ganz anderes Bild vom Kern; dann ist er intensiv und ungleichmäßig gefärbt und ist vor allem von seiner Umgebung durch eine ganz scharfe, dunkle Kontur abgegrenzt. Dies sieht man z. B. von vornherein beim Malachitgrün und Nachtblau; sie wirken giftig, und das dokumentiert sich z. B. darin, daß im Präparat bald viele freie gefärbte Kerne sichtbar werden, daß das Protoplasma sich rasch mitfärbt, körnig zerfällt oder aus dem Randreifen sich herauslöst und verschwindet.

Sowohl das Verhalten des Kerns wie das des chromatoiden Körperchens lehrt also, daß die Farbbasen, einschließlich

der lipoidunlöslichen, wie Thionin, Methylengrün und Methylgrün Krystalle I, die Blutkörperchen intravital färben.

Ganz anders bei den Säurefarbstoffen! Diese färben bis auf wenige Ausnahmen weder das Protoplasma, noch den Kern, noch das chromatoide Kügelchen, oder richtiger: sie färben allenfalls nach langer Zeit und dann homogen durch das ganze Blutkörperchen hindurch. Die wenigen Ausnahmen sind aber Farben, welche offenbar giftig wirken; denn hier tritt die Färbung sofort als sehr intensive Färbung des Kerns (nicht des chromatoiden Kügelchens) auf, der sich ganz scharf konturiert gegen das Protoplasma absetzt, und bald löst sich dann das Protoplasma, so daß die Kerne frei herumschwimmen; dies gilt für Rose bengale und Erythrosin. Ungefärbt bleiben dagegen zunächst die Blutkörperchen in den Lösungen von: wasserlöslichem Anilinblau, Setopalin, Säurefuchsin, Afridolblau, Afridolviolett, Bayrisch Blau, Azoblau, wasserlöslichem Nigrosin, Patentblau A, Säureviolett, Bordeaux R, Croceinscharlach 7 B, Trypanrot, Wollviolett S, Diaminreinblau, Cyanosin, Echtrot A und anscheinend auch Chromgrün, bei welchem ich freilich auch öfter den Eindruck einer sofort eintretenden schwachen diffusen Färbung hatte.

Letztere kommt zweifellos zustande bei vier Farbstoffen, die mir noch zu erwähnen übrig bleiben, nämlich Rhodamin B, 3 B und G extra und Irisamin G. Von diesen Farbstoffen haben wir schon im vorigen Abschnitt erfahren, daß sie das Darmepithel intravital diffus färben. Hier finden wir dasselbe wieder; sofort nach dem Einlegen in die Farblösung erscheinen Zellleib und Kern rosa durchgefärbt, dabei hebt sich der Kern gerade so matt von seiner Umgebung ab wie sonst in der ungefärbten Zelle. Dem chromatoiden Kügelchen scheint aber auch für diese Farben eine etwas größere Speicherungsfähigkeit eigen zu sein; jedenfalls sieht man die Kügelchen hell leuchtend rosa vom Untergrund abstechen.

Ziehen wir nun wieder aus den mitgeteilten Versuchen die für die Lipoidtheorie wesentlichen Schlüsse, so sind diese:

1. die lipoidunlöslichen Methylengrün, Thionin und Methylgrün Krystalle I färben intravital;

2. die lipoidlöslichen Wollviolett S, Echtrot A und Cyanosin färben nicht.

E. Stellungnahme zur Lipoidtheorie.

Nach den Ergebnissen der drei eben mitgeteilten Versuchsreihen ist es Ruhland zuzugeben, daß der von ihm behauptete Mangel eines durchgehenden Parallelismus zwischen Lipoidlöslichkeit und intravitalem Färbvermögen wirklich besteht, freilich, wie wir sahen, und wie auch noch weiter zu zeigen sein wird, nicht ganz in dem Maße, wie er es angegeben hat.

Vergleichen wir seine Seite 63 aufgezählten, in erster Linie der Lipoidtheorie widersprechenden Resultate mit meinen, so zeigt sich:

1. nach Ruhlands und meinem übereinstimmenden Befund färben trotz Lipoidunlöslichkeit die Basen Thionin und Methylengrün intravital; dazu kann ich noch Methylgrün-Krystalle I hinzufügen. Bismarckbraun verhält sich meiner Meinung nach nicht widersprechend, Malachitgrün halte ich wegen seiner Giftigkeit für nicht gut geeignet, um als Beweismittel gegen die Theorie von Overton zu dienen;

2. daß die lipoidlösliche Farbbase Nachtblau intravital nicht färbt, wie Ruhland behauptet, halte ich für nicht richtig.

3. Die von Ruhland angegebene Lipoidlöslichkeit der Sulfosäurefarbstoffe Tuchrot 3 GA, Echtrot A und Wollviolett S kann ich bestätigen, diejenige von Oxaminmarron nicht. Wenn Oxaminmarron nicht intravital färbt, so beweist das also nichts gegen die Lipoidtheorie. Andererseits wird wenigstens das Darmepithel vom Frosch durch Tuchrot 3 GA deutlich gefärbt, wie man es nach seiner Lipoidlöslichkeit erwarten kann; die Spirogyren habe allerdings auch ich farblos gefunden. Dagegen färben Echtrot A und Wollviolett S keins der geprüften Objekte. Die Versuche mit dem stark lipoidlöslichen Wollviolett S, auf welche Ruhland besonderes Gewicht legt, beweisen nun aber nichts, und zwar aus folgendem Grund: ich sah mich dadurch, daß ich in später zu besprechenden Versuchen völlig unerwartet die Niere vom Frosch nach Eingabe von Wollviolett S farblos fand, dazu veranlaßt, zu prüfen, ob dieser Farbstoff nicht vielleicht besonders leicht von Zellen zerstört

wird; das ist in der Tat der Fall. Ich habe 35 Farbstoffe der Wirkung von Leberzellen des Frosches ausgesetzt und keinen gefunden, der annähernd so leicht entfärbt wurde wie das Wollviolett. Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt: einige Stückchen frischer Leber vom Frosch wurden in Reagensröhren mit den ungefähr untereinander gleich stark gefärbten Auflösungen der Farbstoffe in Ringerscher Lösung übergossen und die Röhrchen verkorkt stehen gelassen. Bei Zimmertemperatur war dann bis zum folgenden Tag immer nur die Lösung von Wollviolett S entfärbt. Geprüft wurden folgende Farbstoffe: Bayrisch Blau, wasserlösliches Anilinblau, Oxaminviolett X, Diamingrün B, wasserlösliches Nigrosin, Azoblau, Bordeaux R, Afridolblau, Säurefuchsin, Säureviolett, Kongorot, Heliotrop BB, Croceinscharlach 7 B, Kongobraun, Indulin, Brillantazurin 5 G, Trypanrot, Rose bengale, Oxaminblau 3 R, Kongokorinth B, Echtrot A, Gallein, Erythrosin, Cyanosin, Benzopurpurin 6 B, Diaminrot B, Brillantkongo B und R, Hessisch Bordeaux, Orange R, Ponceau 2 R, Chromgrün, Nachtblau und Rhodamin B. Nächst dem Wollviolett fand ich am leichtesten zu entfärben: wasserlösliches Nigrosin und Croceinscharlach 7 B. Warum das Wollviolett so besonders leicht entfärbt wird, habe ich übrigens nicht weiter verfolgt; um eine Entfärbung nach Art desjenigen des indigoschwefelsauren Natrons durch Reduktion handelt es sich aber nicht, da durch Schütteln mit Luft nicht, wie bei diesem, die Farbe zu restituieren ist.

Nach diesem Ergebnis stehe ich nicht an, das Resultat aller Färbungsversuche mit Wollviolett S als zweifelhaft anzusehen. Gleichzeitig sehe ich in dem Ergebnis aber eine neue Mahnung daran, wie vorsichtig man bei der Beurteilung von Zellfärbungen sein muß, wenn man nicht zu falschen Schlüssen gelangen will.

Von den von Ruhland gegen Overtons Theorie namhaften gemachten vier Sulfosäurefarbstoffen bleibt hiernach einzig das Echtrot A, bei dem das Färbevermögen bis jetzt einwandfrei der Lipoidtheorie entgegenzuhalten ist.

4. Overtons Angaben über Farbstoffe, welche gleichzeitig lipoidunlöslich sind und nicht intravital färben, beziehen sich

so gut wie ausschließlich auf Sulfosäurefarbstoffe. Hier gilt die Lipoidtheorie, wie übrigens auch aus zahlreichen Angaben von Ruhland hervorgeht, fast unbeschränkt; es besteht eben bis jetzt nur die eine, soeben festgestellte Ausnahme Echtrot A. Ruhland hat nun noch einige andere Säurefarbstoffe mit untersucht, welche nicht Sulfosäurefarbstoffe sind, und dabei, wie wir sahen, den Zusammenhang zwischen Lipoidlöslichkeit und Permeabilität vermißt. Von diesen Säurefarbstoffen gehören Cyanosin, Erythrosin, Rose bengale und Gallein in die Gruppe der Phthaleine, nur Chromgrün ist ein Triphenylmethanfarbstoff. Für letzteres stelle ich den Befund von Ruhland in Abrede, daß er Spirogyren nicht färbt; es färbt langsam, aber deutlich und intravital; beim Darmepithel habe ich dieses intravitale Färbevermögen nicht feststellen können, für die Blutkörperchen kann ich nichts Entscheidendes angeben. Dagegen stimme ich Ruhlands Angabe bei, daß Cyanosin, Erythrosin, Rose bengale und Gallein trotz Lipoidlöslichkeit nicht färben. Es ist also eine besondere, bisher nicht beachtete Gruppe von Säurefarbstoffen, die Phthaleine, welche sich anders verhält, als der Lipoidtheorie entsprechen würde. Vielleicht ist diese letztere Tatsache für weitere kritische Prüfungen der Lipoidtheorie von besonderer Wichtigkeit.

5. Ob die von Ruhland hervorgehobene Diskrepanz zwischen dem Grad der Lipoidlöslichkeit der Rhodamine und der Geschwindigkeit ihres Eintritts wirklich besteht, scheint mir nach meinen Beobachtungen noch zweifelhaft.

Wir sehen also, daß sich zwar die Widersprüche zwischen Theorie und Erfahrung, auf welche Ruhland aufmerksam gemacht hat, reduzieren, daß aber doch noch acht Farben übrig bleiben, deren Verhalten durch die Annahme von Overton nicht zu erklären ist.

Danach erheben sich zunächst zwei Fragen: 1. Muß man nach diesen Feststellungen die Lipoidtheorie aufgeben? 2. Ist die Vitalfärbung nach den jetzigen Erfahrungen nicht durch ein anderes Prinzip als das der Lipoidlöslichkeit besser zu erklären?

Wir wollen die zweite Frage zuerst erörtern. Ein Versuch, einen anderen allgemeinen Satz als Ausdruck der Tat-

sachen der Vitalfärbung, als den in der Lipoidtheorie enthaltenen, auszusprechen, wird nach dem Vorangegangenen einem jedem naheliegen. Der Satz ist auch schon öfter genannt, auch von Ruhland beiläufig angeführt, nämlich: die basischen Farbstoffe sind Vitalfarben, die Säurefarbstoffe sind Nichtvitalfarben. Unter den hier vorgebrachten Beobachtungen disharmonieren nur sehr wenige mit dem Satz. Die auffallendste Ausnahme wäre wohl im Nachtblau gegeben gewesen, wenn es, wie Ruhland angibt, als Base nicht vital färbte; aber wir sahen ja, daß diese Angabe nicht zutreffend ist. Dann kommt weiter als Ausnahme Tuchrot 3 GA in Frage, das trotz seiner Säurenatur das Darmepithel vom Frosch färbt, die Spirogyren freilich nicht färbt. Und endlich widerspricht es anscheinend dem Satz, daß Chromgrün als Säurefarbstoff Spirogyren färbt. Nun bezweifle ich aber, ob Ruhlands Bezeichnung des Chromgrüns als Säurefarbstoff berechtigt ist. Es ist nach meiner Ansicht oft nicht möglich, aus der Konstitutionsformel eines Farbstoffes mit Gewißheit abzulesen, ob er basisch oder sauer ist. Aus diesem Grund habe ich, um den genannten Satz besser prüfen zu können, bei einer größeren Zahl von Farben die Richtung der elektrischen Überführung festgestellt und angenommen, daß diejenigen Farben, welche mit dem positiven Strom wandern, basisch, welche mit dem negativen Strom wandern, sauer sind. Ich habe dabei die Spannungsgefälle von 30 bis 220 Volt variiert, die Stromzuführung geschah durch Platinelektroden, Störungen durch elektrolytische Produkte waren in der üblichen Weise durch Verlagerung der Elektroden in besondere Gefäße, die mit dem Ort der elektrischen Überführung, einem U-Rohr, nur durch enge Röhren kommunizierten, ausgeschlossen. Ich vergewisserte mich auf diese Weise, daß

Säurefarbstoffe (also negativ) sind: Azoblau, wasserlösliches Anilinblau, Kongorot, Trypanrot, Afridolblau, Echtrot B, Kongobraun, Afridolviolett, Diamingrün B, Wollviolett S, Tuchrot 3 GA, Cyanosin, Erythrosin, Gallein, Rose bengale; daß

basische Farbstoffe (also positiv) sind: Neutralrot, Toluidinblau, Methylenblau, Safranin, Malachitgrün, Brillantcresylblau, Methylgrün Krystalle I, Nachtblau, Rhodamin B, 3 B, S und 6 G, Irisamin G und Chromgrün.

Chromgrün steht allerdings an der Grenze des basischen und ist wohl fast neutral. Denn in Gefällen von 30 bis 60 Volt, in denen viele Farben schnell und deutlich reagierten, war beim Chromgrün keine Bevorzugung einer Wanderungsrichtung zu erkennen, und erst bei 110 Volt kam die kathodische Wanderung deutlich zum Vorschein. Mit diesem schwach basischen Charakter mag das vorhandene, aber geringe vitale Färbungsvermögen zusammenhängen.

Es ist danach ersichtlich, daß der Satz: basische Farbstoffe färben vital, saure Farbstoffe färben nicht vital, fast ausnahmslos gilt. Und daß er die Tatsachen besser ausdrückt als der Satz von Overton, mag durch folgende Tabelle über das Verhalten der strittigen Farben gezeigt werden:

Farbstoff:	Lipoidlöslichkeit:	Intravitales Färbvermögen:	Elektrische Ladung:
Thionin	—	+	+
Methylengrün	—	+	+
Metylgrün Krystalle I	—	+	+
Nachtblau	+	+	+
Rhodamin B	+	+	+
Tuchrot 3 GA	+	+—	—
Echtrot A	+	—	—
Rose bengale	+	—	—
Cyanosin	+	—	—
Erythrosin	+	—	—
Gallein	+	—	—

Obgleich hiernach der aufgestellte allgemeine Satz den Tatsachen wirklich gut Rechnung trägt, so will ich mich nun weiterhin doch vorläufig nicht auf die naheliegende Frage einlassen, wie etwa dieser Zusammenhang zwischen Basizität bzw. Führung einer positiven Ladung und intravitalem Färbevermögen aus den Eigenschaften der Zelloberfläche erklärt werden könnte. Zunächst kam es mir nur darauf an, zu zeigen, daß es hier, wie so oft, mehr als eine parallele Erscheinungsreihe gibt, die zur „Erklärung“ herangezogen werden kann. Schließlich wird man natürlich diejenige Erklärung für die beste erachten, welche mit den wenigsten Tatsachen in Konflikt gerät.

Damit komme ich nun aber auch zu der zweiten der vorher gestellten Fragen: Ist die Lipoidtheorie nach dem Ausfall der Versuche von Ruhland und mir als erledigt anzusehen? Ich glaube nicht, daß man, selbst wenn von Overton bisher nichts als die Versuche über Vitalfärbung zugunsten seiner Theorie angeführt worden wäre, beim augenblicklichen Stand der Dinge diese Frage bestimmt bejahen könnte. Denn gerade Fälle, wie der des Wollviolett, weisen einen recht nachdrücklich auf die Möglichkeit hin, daß jeden Augenblick auch für das Verhalten der wenigen andern, anscheinend der Lipoidtheorie widersprechenden Farben ein befriedigender Grund gefunden werden könnte. Aber vor allem machen ja doch die Farbstoffe nur einen kleinen Teil der vielen Verbindungen aus, an denen sich die Lipoidtheorie bisher bewährt hat, und abgesehen von den Farbexperimenten hat bisher kein wesentlicher Einwand gegen die Theorie erhoben werden können. Das möchte ich auch besonders gegenüber dem experimentellen Hinweis von Ruhland[1]) betonen, daß bei gewissen Pflanzenzellen lipoidunlösliche Salze bis zum Konzentrationsausgleich eindringen. Dieser Beobachtung, die vollkommen richtig sein kann, stehen viele Beobachtungen, die auch Ruhland anerkennen wird, zur Seite, daß bei anderen Zellen die Konzentrationsdifferenzen zwischen Zellinhalt und Umgebung lange Zeit bestehen bleiben, und da handelt es sich dann immer um Verbindungen, die aus Lipoidunlöslichkeit nicht diosmieren können. Die Ruhlandschen Salzversuche können also nicht gegen Overton angeführt werden. Dagegen sei doch noch daran erinnert, wie gut die Lipoidtheorie die physikalische Permeabilität der Blutkörperchen, der Muskeln und der Körperoberfläche sowie die Erscheinungen der Narkose erklärt; es sei auch noch die auffallende Tatsache hervorgehoben, daß von der Darmschleimhaut die (lipoidunlöslichen) Nahrungsstoffe, Zucker, Salze, Aminosäuren langsamer resorbiert werden als allerlei (lipoidlösliche) giftige Fremdstoffe, eine Erscheinung, die man, wie O. Cohnheim[2]) es tut, schon extra ignorieren muß, um bei der Analyse der Resorptionsfunktion die Lipoidtheorie beiseite

---

[1]) l. c. S. 38.

[2]) Nagels Handbuch der Physiologie 2, 608 ff.

schieben zu können. Trotz alledem halte ich es bei der gegenwärtigen Sachlage für möglich, daß sich noch eine mehr oder minder große Umformung der Lipoidtheorie von Overton als nötig erweist. Aber auf alle Fälle wird auch dann das Faktum der zweierlei Permeabilität bestehen bleiben, d. h. das Faktum der weitestgehenden Homogenität der Zellen bezüglich der Permeabilität für die eine Gruppe von chemischen Verbindungen (der sog. lipoidlöslichen) und der Inhomogenität bezüglich der Permeabilität für die andere Gruppe (der sog. lipoidunlöslichen).

Die Farbaufnahme von seiten der Nierenzellen.

Ich wende mit nunmehr zur Besprechung von Versuchen über die Aufnahme von solchen Farbstoffen, welche im allgemeinen nicht intravital die Zellen färben, sondern nur in besonderen Fällen in deutlichem Maß inkorporiert werden. Solche Versuche können nach der Auffassung, welche ich vorher auseinandergesetzt habe, zur Aufklärung des bisher rätselhaften Vorgangs beitragen, durch welchen überhaupt lipoidunlösliche Stoffe, wie es eben die nicht vitalen Farben im allgemeinen auch sind, aufgenommen werden. Es handelt sich um Versuche über Farbaufnahme von seiten der Nierenzellen, welche eine Fortsetzung ähnlicher bereits von mir veröffentlichter Versuche bilden.[1]) Daß es sich bei dieser Farbaufnahme um nichts weiter als ein bloßes Hineindiffundieren handelt, halte ich gerade in Anbetracht der komplizierten Funktion der Leistung einer Konzentrationsarbeit von seiten der Nierenzellen für sehr wenig wahrscheinlich. Die Nierenzellen wurden als Untersuchungsobjekt deswegen gewählt, weil sie an Aufnahmevermögen für Farben alle andern Zellen überragen, und es wurde nun die Frage aufgeworfen, ob dieses Vermögen unbegrenzt ist, weil mir die Beantwortung dieser Frage für eine künftige Erklärung der nicht diosmotischen Stoffaufnahme (Aufnahme der lipoidunlöslichen Stoffe) wichtig erschien.

Ich bin auf Grund der früheren Versuche bisher zu folgenden zwei Sätzen gelangt:

---

[1]) Diese Zeitschr. 11, 105, 1908 und Zeitschr. f. Chem. u. Industrie der Kolloide 3, 1908.

1. „Wenn ein Farbstoff von den Epithelien der Niere nicht aufgenommen werden kann, dann ist er hochkolloidal. (Aber man darf diesen Satz nicht umkehren.)

2. Wenn ein Farbstoff wenig, bzw. nicht kolloidal ist, so wird er leicht aufgenommen."

Danach kann also das Importvermögen der Nierenzellen durch einen gewissen Grad von Kolloidität begrenzt sein.

Auch die Aufstellung dieser Regeln ist von seiten Ruhlands in der zweiten seiner Veröffentlichungen beanstandet worden. Zur Begründung der Ansicht, daß es für die Farbaufnahme auf das kolloidale Verhalten der Farbstoffe gar nicht ankomme, führt er Versuche über die intravitale Färbbarkeit von Pflanzenzellen an, welche folgendes Ergebnis lieferten:

	Es dringen ein:	Es dringen nicht ein:
Echt gelöste F.	Methylenblau, Malachitgrün Thionin, Gentianin, Thioninblau, Gentianaviolett, Methylengrün, Methylgrün.	Eosin, Wollviolett S, Indigcarmin, Erioglaucin.
HalbkolloidaleF.	Neutralrot-Chlorhydrat, Rosanilin- und Pararosanilinsalze, Nilblau, Dahlia, Prune pure.	Erythrosin, Rose bengale.
HochkolloidaleF.	Neutralrot-Base.	Phloxin, Echtrot, Oxaminmarron, Tuchrot 3 GA.

Hier fehlt in der Tat jede Beziehung zwischen Färbevermögen und Kolloidität, und es kommt bloß wieder die Beziehung zum sauren oder basischen Verhalten, bzw. zur Lipoidlöslichkeit zum Vorschein. Aber darin erblicke ich auch nicht den mindesten Widerspruch mit meinen Versuchen an der Niere. Denn diese handeln ausschließlich von Verbindungen, welche lipoidunlöslich sind, welche also im allgemeinen nicht diosmotisch eindringen, sondern nur in besonderen Fällen, z. B. im Fall, daß sie der Niere geboten werden. Wo es sich aber um nicht diosmotische Permeabilität handelt, da entscheidet das Objekt beinahe alles, und Versuche an Spirogyren- und an Nierenzellen sind einfach inkommensurabel.

Aber Ruhland zweifelt auch die von mir für die Niere aufgestellten beiden Sätze an, indem er auf Grund seiner

Spirogyren-Erfahrungen die Meinung ausspricht, daß sich vielleicht bei Prüfung eines größeren Farbenmaterials — ich hatte meine Schlüsse aus den Versuchen an 32 Farben gezogen — auch die beiden Sätze in die allgemeine Regellosigkeit verflüchtigt haben würden, welche ihm aus allen Permeabilitätsversuchen bisher hervorsticht. Meine weiterhin mitzuteilenden Versuche, welche sich auf weitere 34 Farbstoffe beziehen, rechtfertigen indessen diese Meinung nicht.

Ich habe jetzt auf ihr Verhältnis zur Niere folgende Farben untersucht:

Von den Farbenfabriken vorm. F. Bayer & Co.: Benzopurpurin 4B und 6B, Chrysamin G, Azoblau, Kongokorinth B und G, Brillantkongo G und R, Benzonitrolbraun 2R, Afridolblau, Echtrot A, Diaminrot B, Brillantazurin 5G, Heliotrop BB, Benzodunkelgrün, Benzoblau BB, 2B und 3B, Afridolviolett, Benzoreinblau;

von der Badischen Anilin- und Sodafabrik: Oxaminmarron, Oxaminviolett X, Kolumbia-Echtscharlach 4B, Wollviolett S, Echtrot B;

von Sandoz & Co.: Cyanosin, Rose bengale, Trisulfonblau B;

von Cassella: Diaminreinblau;

von Geigy: Setopalin;

von Grübler: Trypanrot, Erythrosin;

von den Höchster Farbwerken: Naphthalingrün V, Echtsäurephloxin.

A. Untersuchungen über die Kolloidität der verwendeten Farbstoffe.

Zur Untersuchung des Zustandes dieser Farben in wässeriger Lösung habe ich wieder, wie früher, ihre Diffusibilität, ihre Fällbarkeit und ihr ultramikroskopisches Verhalten bestimmt.

1. Die Diffusibilität der Farbstoffe: Zu ihrer Messung wurden wieder 0,1 %ige Lösungen der Farben in Diffusionshülsen von Schleicher und Schüll gefüllt und gegen destilliertes Wasser diffundieren gelassen. Der Fortschritt der Diffusion wurde mit Hilfe eines Krüßschen Colorimeters beurteilt.

Ich kam zu folgender Reihenfolge in der Diffusibilität:

Wollviolett S, Setopalin (Durchtritt nach $^1/_2$ bis $^3/_4$ St.);

Naphthalingrün V, Echtsäurephloxin (nach 1 St.);

Rose bengale (nach ca. 2 St.);

Cyanosin (nach ca. 6 St.);

Echtrot B, Erythrosin (nach ca. 7 St.);

Echtrot A;

Benzoblau 2B und 3B, Chrysamin G, Kolumbia-Echtscharlach 4B (nach 2 bis 3 Tagen);

Heliotrop BB (nach 7 Tagen);

Benzodunkelgrün, Benzoreinblau, Azoblau, Afridolblau, Trisulfonblau B, Afridolviolett, Diaminreinblau, Trypanrot, Oxaminviolett X, Benzoblau BB, Brillantkongo R und G, Kongokorinth B, Diaminrot B, Brillantazurin 5G, Oxaminblau 3R, Benzopurpurin 4B und 6B, Oxaminmarron, Benzonitrolbraun 2R (keine Diffusion).

2. Die Fällbarkeit der Farbstoffe: Sämtliche hier zur Verwendung gelangten Farben sind Säurefarbstoffe; soweit sie kolloidal sich lösen, können sie also eventuell durch mehrwertige Kationen gefällt werden. Dementsprechend wurde wieder, wie früher, die Fällbarkeit durch Zusatz von 2 ccm 2- bis 0,002fach normalen Lösungen von $CaCl_2$ oder $NiCl_2$ zu 2 ccm der 0,1 $^0/_0$igen Farblösungen untersucht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt; darin bedeuten die Plus-Zeichen, daß und ungefähr wieviel Niederschlag sich nach 24 Stunden abgesetzt hat, Minus-Zeichen bedeuten, daß keine Ausflockung zustande kam.

Es ist ersichtlich, daß Calcium- und Nickelchlorid im wesentlichen die Farbstoffe in der gleichen gegenseitigen Abstufung ausfällen.

Dagegen kann von einem Parallelismus zwischen Diffusibilität und Elektrolytfällbarkeit bei dieser Serie von Farben, im Gegensatz zu den beiden früher von mir untersuchten, gar keine Rede sein.

Zwar sind die leicht fällbaren Farben zugleich auch indiffusibel oder schwer diffusibel, wie: Oxaminmarron, Azoblau, Benzopurpurin 4B und 6B, Kongokorinth B, Oxaminviolett X, Brillantkongo R, Benzonitrolbraun 2R, Afridolblau, Diaminrot B, Brillantazurin 5G, Oxaminblau 3R; auch Kolumbia-Echtscharlach 4B, Echtrot A, Chrysamin G und allenfalls Cyanosin können noch mit hierher gezählt werden. Alle diese Farben verhalten sich wie typische Suspensionskolloide.

a) Fällung mit Calciumchlorid.

Normalität	2	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,002
Brillantazurin 5 G	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	–	–	–
Diaminrot B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	–	–	–
Oxaminblau 3 R	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	–	–
Echtrot A	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+
Afridolblau	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Kolumbia-Echtscharlach 4 B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	–
Benzonitrolbraun 2 R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
Brillantkongo R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
Oxaminviolett X	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	–
Kongokorinth B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Azoblau	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Chrysamin G	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
Benzopurpurin 6 B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	–
Benzopurpurin 4 B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Oxaminmarron	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

Normalität	2	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,002
Setopalin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Echtsäurephloxin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Naphthalingrün V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Erythrosin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Trypanrot	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Diaminreinblau	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Trisulfonblau B	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Benzoreinblau	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
Rose bengale	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
Benzoblau 3B	++	++	++	–	–	–	–	–	–	–
Benzoblau BB	++	+	+	+	–	–	–	–	–	–
Echtrot B	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
Wollviolett S	++	++	+	+	Spur	Spur	Spur	–	–	–
Afridolviolett	++	++	++	++	+	+	–	–	–	–
Benzoblau 2B	++	++	++	++	++	+	–	–	–	–
Brillantkongo G	+	+	+	+	+	+	+	Spur	–	–
Benzodunkelgrün	+	+	++	++	++	++	+	–	–	–
Heliotrop BB	++	++	++	++	++	++	Spur	–	–	–
Cyanosin	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+

b) Fällung mit Nickelchlorid.

Farbstoff / Normalität	2	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,002
Brillantazurin 5 G	+++	+++	+++	+++	++	++	++	–	–	–
Cyanosin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	Spur
Echtrot A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	Spur	Spur
Afridolblau	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++
Benzopurpurin 4 B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+
Kolumbia-Echtscharlach 4 B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	–
Benzonitrolbraun 2R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Brillantkongo R	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	Spur
Oxaminviolett X	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	Spur
Kongokorinth B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Chrysamin G	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
Benzopurpurin 6 B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Azoblau	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Oxaminmarron	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

Farbstoff / Normalität	2	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,002
Setopalin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Echtsäurephloxin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Naphthalingrün V	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Trypanrot	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Diaminreinblau	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Benzoreinblau	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Trisulfonblau B	+	+	+	+	+	+	Spur	–	–	–
Afridolviolett	++	++	+	–	–	–	–	–	–	–
Brillantkongo G	++	+	+	+	+	Spur	Spur	Spur	–	–
Erythrosin	++	++	+	Spur	Spur	Spur	Spur	–	–	–
Rose bengale	++	++	+	+	Spur	–	–	–	–	–
Heliotrop BB	++	++	++	Spur	–	–	–	–	–	–
Echtrot B	++	++	+	+	Spur	Spur	–	–	–	–
Wollviolett S	++	++	+	+	+	+	+	+	+	–
Benzoblau 3B	++	++	++	++	+	–	–	–	–	–
Benzoblau BB	++	++	++	++	+	–	–	–	–	–
Benzoblau 2B	+++	++	++	++	++	++	++	–	–	–
Benzodunkelgrün	++	++	++	++	++	+	+	Spur	–	–
Oxaminblau 3R	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	Spur	–	–

Auf der andern Seite finden wir auch, daß die leicht diffusiblen Farben schwer oder nicht fällbar sind, wie: Setopalin, Naphthalingrün V, Echtsäurephloxin, Rose bengale und Wollviolett S.

Dagegen gibt es eine ganze Anzahl Farben, welche ihrer Indiffusibilität nach hochkolloidal und doch nicht oder schwer fällbar sind; solche sind: Benzoreinblau, Trisulfonblau B, Trypanrot, Afridolviolett und Diaminreinblau. Ihnen sehr ähnlich durch geringe Diffusibilität bei relativ geringer Fällbarkeit sind noch: Benzodunkelgrün, Benzoblau 3B und BB, Heliotrop BB und Brillantkongo G. Ferner gehören auch einigermaßen hierher: Echtrot B, Erythrosin und Benzoblau 2B.

Wir stoßen hier also auf einen neuen Typus von hochkolloidalen Farben, welcher sich von dem der bisher untersuchten hochkolloidalen Farben durch seine geringe Fällbarkeit auszeichnet. Damit stoßen wir aber nicht auf einen bisher unbekannten Typus von Kolloiden überhaupt. Denn offenbar haben diese Farben ihr Analogon in hochkolloidalen Substanzen, wie Eiweiß oder Glykogen oder Gelatine, welche bei mangelnder Diffusibilität doch relativ wenig elektrolytempfindlich sind, wenig etwa im Vergleich mit kolloidalem Platin, Gold oder Arsentrisulfid. Wir haben es hier offenbar mit Kolloiden zu tun, die ich früher als hydrophile Kolloide den Suspensionskolloiden gegenübergestellt habe.[1])

Ich will hier auf deren einzelne Unterschiede nicht eingehen; die Hauptsache ist, daß die Lösungen der ersteren den echten Lösungen nahestehen, die der zweiten den Suspensionen, und das dokumentiert sich auch gut in einer Eigenschaft, welche ich hier, um die Klassifizierung der genannten Farben unter die hydrophilen Kolloide nicht bloß auf die Fällbarkeit zu basieren, mit untersucht habe; es ist dies das ultramikroskopische Aussehen.

3. Das ultramikroskopische Bild der Farblösungen: Die Lösungen wurden mit einem Zeissschen Apparat untersucht. Das Wasser zur Herstellung der Lösungen wurde nach dem Reinigungsverfahren von Hulett[2]) hergestellt; es wurde

[1]) Physikal. Chemie der Zelle und der Gewebe, 2. Aufl., 1906, 208.
[2]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 21, 297, 1896.

so zwar nicht optisch leer, zeigte aber doch im ultramikroskopischen Bilde nur relativ wenige, kleine und wenig leuchtende Teilchen, welche die Untersuchungen nicht störten. Von leicht fällbaren hochkolloidalen Farben habe ich untersucht: Kongorot, Azoblau, Bayrisch Blau und Afridolblau, von schwer oder nicht fällbaren hochkolloidalen: Trypanrot, Diaminreinblau, Trisulfonblau B und Afridolviolett. Die Ergebnisse sind folgende:

Versuch 1: Kongorot. Hell gelbrote Lösung.

Mäßig viele große farblose und hell orange gefärbte Teilchen auf dunklem Grunde.

Trypanrot. Hell gelbrote Lösung.

Sehr wenige, aber ziemlich große, farblose Teilchen auf grauem Grunde.

Versuch 2: Bayrisch Blau. Hellblaue Lösung.

Zahllose große, bewegliche Teile in allen Farben auf dunklem Grunde.

Diaminreinblau. Hellblaue Lösung.

Viel weniger, meist farblose, kleinere Teilchen auf fast dunklem Grunde.

Versuch 3: Azoblau. Violette Lösung.

Zahlreiche große und kleine, bunte, vorwiegend aber orangefarbene oder farblose, zitternd bewegliche Teilchen auf schwarzem Grunde.

Trisulfonblau B. Blaue Lösung, etwas weniger intensiv gefärbt als die vorige.

Viel weniger und kleinere bewegliche Teilchen auf etwas grauem Grunde.

Afridolblau. Blaue Lösung von ganz demselben Aussehen wie die Trisulfonblau-Lösung.

Massenhaft sehr große, orangefarbene Teilchen auf dunklem Grunde.

Afridolviolett. Rotviolette Lösung.

Dunkel violettroter Strahlenkegel mit spärlichen kleinen, weißen, schwach beweglichen Teilchen.

Versuch 4: Afridolblau. Ganz hell blauviolette Lösung.

Massenhaft kleine, auch viele große weiße, gelbe und orangefarbene Teilchen auf fast schwarzem Grund.

Trisulfonblau B. Ebenso hellblaue Lösung wie die vorige.

Außerordentlich wenige kleine Teilchen auf dunklem Grund.

Afridolviolett. Hellviolette Lösung.

Außerordentlich wenige farblose Teilchen auf dunklem Grund.

Die Ergebnisse sind klar genug: die leicht fällbaren Farben erweisen sich durch die Massenhaftigkeit der Ultramikronen als Suspensionen, die schwer fällbaren sind dagegen arm an solchen, ihre Lösungen ähnlich den echten Lösungen.

B. Das Verhalten der Froschniere gegenüber den Farbstoffen.

Die Versuche am Frosch wurden wieder, so wie früher, in der Art ausgeführt, daß die Farbstoffe entweder in den Rückenlymphsack in Substanz, oder in die Bauchvene in Ringer-Lösung (bei Schwerlöslichkeit der Farbe ev. auch in rein wässeriger Lösung) gebracht, und daß die Nieren dann meist nach 1 oder auch 2 Tagen frisch in Ringer-Lösung untersucht wurden.

Die Resultate seien zunächst summarisch in Form einer Tabelle, in welche auch die früheren Erfahrungen mit aufgenommen sind, wiedergegeben:

Von den Nierenzellen werden aufgenommen:

a) Wenig oder nicht kolloidale F.: Setopalin, Naphthalingrün V, Echtsäurephloxin, Rose bengale, Indigcarmin, Orange II und GG, Ponceau B und 2R, Säurefuchsin, Patentblau A und V, Naphtholgelb S, Coccinin, Erioglaucin, Lichtgrün SF, Guineagrün B, Brillantcrocein 3B (18).

b) Halbkolloidale F.: Indulin, wasserlösliches Nigrosin (wenig aufgenommen); Benzoblau 2B, Cyanosin (4).

c) Hydrophil-kolloidale F.: Benzoreinblau, Trisulfonblau B, Trypanrot, Afridolviolett, Diaminreinblau.

Halbhydrophile: Säureviolett 6B, wasserlösliches Anilinblau, Benzodunkelgrün, Benzoblau 3B und BB, Heliotrop BB, Brillant-Kongo G, auch Echtrot B, Erythrosin (14).

d) Suspensionskolloidale F.: Kongorot, Bayrisch Blau, Biebricher Scharlach, Chrysamin G, Echtrot A, Brillantkongo R (6).

Nicht oder nur wenig werden von den Nierenzellen aufgenommen:

a) Wenig oder nicht kolloidale F. [Wollviolett S].

b) Hydrophil-kolloidale F. —

c) Suspensionskolloidale F.: Oxaminmarron, Benzonitrolblau 2 R, Azoblau, Diaminrot B, Benzopurpurin 6 B, Oxaminblau 3 R, Kongokorinth B, Oxaminviolett X, Brillantazurin 5 G, Berliner Blau, Alkaliblau 3 B, Violettschwarz, Benzoazurin, Diamingrün B; ein wenig: Hessisch Bordeaux, Salmrot, Croceinscharlach 7 B, Palatinschwarz, Benzopurpurin 4 B, Afridolblau, Kolumbia-Echtscharlach 4 B (21).

Diese Übersicht bedarf nun noch einiger ergänzender Bemerkungen.

Die einzige nicht kolloidale Farbe unter 19 untersuchten, welche die Nierenzellen nicht färbte, war Wollviolett S, was gegen den zweiten der von mir S. 79 für die Nierenfärbung aufgestellten Sätze verstößt. Dies erschien mir so sonderbar, daß ich an eine nur scheinbare Ausnahme glaubte, und es ist ja denn auch bereits Seite 73 gezeigt worden, daß in der Tat das Wollviolett S darin einzig dasteht, daß es überaus leicht entfärbt wird. So darf wohl angenommen werden, daß das Wollviolett S so gut wie die übrigen nicht kolloidalen Farben von den Nierenzellen aufgenommen werden kann, und daß es nur deshalb nicht dort sichtbar wird, weil es entweder vor der Aufnahme von anderen Organen (Leber) oder unmittelbar nach der Aufnahme von den Nierenzellen zerstört wird.

Sodann könnte man gegen die Beweiskraft einiger Versuche, welche das Nichteindringen von suspensionskolloidalen Farben zeigen sollen, geltend machen, daß auch die konzentrierten Lösungen der betreffenden Farben nur eine geringe Färbekraft haben, daß daher die Unsichtbarkeit der Farben in der Niere nicht sicher ihr Unvermögen, einzudringen, beweise; solche Farben sind: Oxaminmarron, Kolumbia-Echtscharlach 4 B, Benzonitrolbraun 2 R und Kongokorinth B. Dem ist aber entgegenzuhalten, daß auch die Lösungen von Naphthalingrün V, Chrysamin G, Echtsäurephloxin u. a. nur wenig kräftig gefärbt sind und doch in den Nierenzellen erscheinen.

Ein weiterer Einwand gegen die Versuche mit den sus-

pensionskolloidalen Farben ist mir von Professor Pelet-Jolivet (Lausanne) schriftlich und dann auch beiläufig in einer seiner Abhandlungen[1]) geäußert worden, nämlich: die Farblosigkeit der Nierenzellen beweise vielleicht gar nicht das Unvermögen vieler suspensionskolloidaler Farbstoffe, in die Nierenzellen einzudringen, sondern könne darauf beruhen, daß die Kolloide leicht durch Adsorption gebunden bzw. ausgefällt würden. Hiergegen ist indessen zu sagen, daß ich das ganze Blutgefäßsystem der Niere, einschließlich der Glomeruli, besonders oft nach Einverleibung der suspensionskolloidalen Farben, z. B. nach Zufuhr von Diamingrün B, Afridolblau, Azoblau, Diaminrot B, strotzend mit der gelösten Farbe gefüllt gefunden habe, ohne daß das Epithel sich gefärbt zeigte.

Endlich möchte ich dem Einwand zuvorkommen, daß über Aufnahme oder Nichtaufnahme nicht der physiko-chemische, sondern der chemische Charakter der Farben entscheide. Das starke Färbevermögen aller hydrophil-kolloidalen Farben könnte ja z. B. leicht zu der Vermutung Anlaß geben, daß diese Farben, die größtenteils Benzidinfarbstoffe sind, den Affinitäten des Benzidins (bzw. Toluidins oder Dianisidins) zu den Nierenzellen ihr Färbevermögen denken. Aber auch Kongobraun, Brillantazurin, Azoblau, Kongokorinth B u. a. gehören zu den Benzidinfarbstoffen und färben doch nicht. Chemische Gesichtspunkte lassen sich also offenbar hier nicht geltend machen.

Es bleibt nun noch übrig, über die Lokalisation der Farben in den gefärbten Zellen etwas zu sagen. Wie ich schon früher hervorgehoben habe, gehen die Farben ganz vorzugsweise in die Epithelien der zweiten und dritten Abschnitte der Nierenkanälchen und lagern sich dort in Granula ab. Dies gilt nun auch jetzt wieder für fast alle der neu untersuchten Farbstoffe. Bemerkenswert scheint mir jedoch, daß in einzelnen Fällen auch eine diffuse Färbung auftrat, welche aber auch vorzugsweise die zweiten und dritten Abschnitte betraf; dies gilt für Rose bengale, Erythrosin und Cyanosin, also die im ersten Abschnitt dieser Abhandlung genannten Phthaleine, von denen auch dort schon hervorgehoben wurde, daß sie diffus färben (s. S. 74). Ich habe schon dort betont, daß ich die Diffusfärbung nicht

[1]) Zeitschr. f. Chem. u. Industrie der Kolloide 3, 275, 1908.

für den Ausdruck einer postvitalen Färbung halte; in dieser Meinung wird man bestärkt, wenn man, wie hier bei der Niere, die Diffusfärbung auf bestimmte Teile der Nierenkanälchen lokalisiert oder wenigstens dort stärker ausgesprochen findet.

So viel von diesen Versuchen! Nach all dem kann man wohl an den früher aufgestellten zwei Sätzen festhalten und noch eine Ergänzung hinzufügen, nämlich:

1. Wenn ein Farbstoff wenig bzw. nicht kolloidal ist, so wird er von den Nierenzellen leicht aufgenommen.

2. Wenn ein Farbstoff hydrophil-kolloidal ist, so wird er ebenfalls leicht aufgenommen.

3. Wenn ein Farbstoff von den Nierenzellen nicht oder schwer aufgenommen wird, dann ist er suspensionskolloidal. Dieser Satz gilt aber nicht umgekehrt.

C. Das Verhalten der Säugerniere gegenüber den Farbstoffen.

Die bei den Versuchen an den Fröschen gewonnenen Erfahrungen habe ich auch auf die Säugerniere auszudehnen begonnen; leider ist es da nicht so leicht, bestimmte Resultate zu erzielen, weil die Farbstoffausscheidung in den Harn sich viel rascher vollzieht als bei den Fröschen, und es mehr Glückssache ist, daß man gerade die allein für die Untersuchung brauchbare Zeit abpaßt, in welcher der Farbstoff aus der Blutbahn in den Harn übertritt. Ich habe mich deshalb vorläufig darauf beschränken müssen, festzustellen, ob die Säugerniere sich von der Froschniere irgendwie abweichend verhält in Beziehung auf die diskutierte physiko-chemische Eigenschaft der Farben.

Über das Importvermögen der Säugerniere für die Farben weiß man bisher eigentlich recht wenig. Seit den alten Untersuchungen von Chrzonszczewsky und Heidenhain haben sich lange Zeit die Experimente immer nur auf Carmin und indigschwefelsaures Natron erstreckt. Erst neuerdings sind auch noch einige andere Farben probiert worden. So injizierte Arnold[1]) subcutan Mäusen Lösungen von Neutralrot und Me-

[1]) Virchows Archiv 169, 1, 1902.

thylenblau, also Farbbasen, von denen man wohl von vornherein erwarten darf, daß sie die Nierenzellen färben, ohne daß dies dann etwas für besondere Importfähigkeiten der Niere, welche uns ja in erster Linie interessieren, beweisen könnte. Arnold fand als Effekt mehrerer in kurzen Zeitabständen aufeinander folgenden Injektionen in den Epithelien der gewundenen Harnkanälchen in deren innerem Drittel, d. h. zwischen Kern und Stäbchensaum, nach längerer Zeit auch über die übrige Zelle verbreitet mit Farbstoff getränkte Granula. Basler[1]) macht für den Säurefarbstoff Kongorot die Angabe, daß es nach intravenöser Injektion bei Kaninchen in den Epithelien der Tubuli contorti zu finden sei; nach Durchspühlung der Nieren mit Salzsäurealkohol wiesen die Epithelien dort eine diffuse Bläuung auf. Eine Ablagerung (lipoidunlöslicher) Säurefarbstoffe innerhalb von Granula bei Säugetieren ist bisher nur zweimal angegeben worden; nämlich P. Ehrlich und Shiga[2]) berichteten beiläufig über rote körnige Ablagerungen ihres Trypanrotes in den Organen von Mäusen, und Brugnatelli[3]) teilte vor kurzem mit, daß bei Mäusen, Katzen und Hunden nach intravenöser Injektion von Benzoblau 3 B eine schöne und lang anhaltende Granulafärbung der Epithelien der Bowmanschen Kapsel und der Tubuli contorti erster Ordnung bis zur Henleschen Schleife hin auftrete.

Meine eigenen bisherigen Versuche erstrecken sich auf basische und Säurefarbstoffe und umfassen unter den letzteren Substanzen mit den verschiedenen Graden und Formen der Kolloidität.

Die Versuche wurden teils an Mäusen, teils an jungen Kaninchen ausgeführt. Den Mäusen wurde gewöhnlich, so wie es Arnold getan hat, 3 bis 5mal in Abständen von 10 bis 20 Minuten je 1 ccm Farblösung subcutan injiziert; die Farbstoffe waren meist in 0,9 $^0/_0$iger NaCl-Lösung gelöst. Einige Zeit nach der letzten Injektion (ca. $^1/_4$ Stunde) wurden die Tiere mit Chloroform getötet. Die Kaninchen bekamen die Farblösung intravenös zugeführt, gewöhnlich 15 bis 20 ccm innerhalb 40 bis

---

1) Pflügers Archiv 112, 203, 1906.
2) Berl. klin. Wochenschr 1904, Nr. 13.
3) Archives ital. de biologie 48, 413, 1908.

50 Minuten; 2 bis 10 Stunden später wurden sie getötet. Die Nieren wurden in jedem Fall sofort untersucht, jede Fixierung ist überflüssig oder irreführend; sie wurden mit dem Gefriermikrotom geschnitten und die Schnitte in Ringer-Lösung gelegt.

a) Farbbasen: Von solchen wurden Mäusen injiziert: Methylenblau, Toluidinblau, Neutralrot, Bismarckbraun, Methylviolett und Brillantcresylblau. Die ersten vier erschienen in stark gefärbten Granula innerhalb der Zellen der Tubuli contorti und nur dort in dieser Form. Die gefärbten Granula lagen, wie Arnold es auch gefunden hat, am Innensaum der Epithelien. Die Glomeruli waren in allen diesen Versuchen farblos, die Marksubstanz oft, seltener auch die Rindensubstanz diffus gefärbt; war letzteres der Fall, so fehlte die Granulafärbung. Nach Injektion von Methylviolett und Brillantcresylblau erhielt ich bis jetzt nur Diffusfärbung.

Wenn auch die Lokalisation der gefärbten Granula in den Epithelzellen der Tubuli contorti vielleicht als Ausdruck besonderer Importfähigkeiten gerade dieser Abschnitte der Nierenkanälchen gelten kann, zumal wenn man die gleiche Farblokalisation nach Injektion von Carmin und indigschwefelsaurem Natron berücksichtigt, so sind doch für die Analyse der Nierenfunktion jedenfalls noch besser Versuche mit Säurefarbstoffen auszunützen, welche eben speziell von den Zellen der Niere gespeichert werden können, während ja die Farbbasen, wie wir früher sahen, in alle Zellen eo ipso eindringen können. Wichtiger erscheinen mir deshalb die folgenden Versuche.

b) Säurefarbstoffe:

α) Nicht oder wenig kolloidale F.: Von solchen wurden bei Mäusen verwendet: Erioglaucin, Coccinin, Guineagrün B, Säurefuchsin, Indigcarmin und Brillantcrocein. Diese Farbstoffe färbten weitaus am häufigsten diffus; bald lag die Farbe mehr im Mark, bald mehr in der Rinde, und in dieser zeigten sich manchmal, besonders leicht nach Brillantcrocein-Zufuhr, deutlich nur die Zellen der Tabuli contorti gefärbt, während die Markstrahlen dazwischen ungefärbt aussahen. In einem von vier Versuchen mit Erioglaucin kam aber auch eine deutliche Granulafärbung heraus; das zugehörige Protokoll lautet:

Injektion von 1 ccm Erioglaucin in NaCl-Lösung. Eine Viertel-

stunde nach der Injektion Ohren gebläut. Nach 3 Stunden getötet. Niere: Rinde fleckenweise blau durch fleckige Färbung der Tubuli contorti. Die Färbung ist meist diffus, aber an einzelnen Stellen auch dunkelblau-granulär. Marksubstanz peripher farblos, zentral stark blau; hier sind die Zellen diffus gefärbt. In der Papilla renalis liegen amorphe Farbmassen in den Lumina.

Auch nach Injektion von reinstem Indigcarmin nach Heidenhain (von Grübler) erhielt ich einmal eine, wenn auch schwache Granulafärbung in den Tubuli contorti. Bisher ist, soviel ich weiß, in allen Versuchen mit dem indigschwefelsauren Natron immer nur Diffusfärbung beobachtet worden; es wurde aber auch fast immer nur fixiertes Gewebe untersucht, und da die Granulafärbung etwas sehr Vergängliches ist, so konnte sie deshalb nicht gefunden werden. Endlich glaube ich auch mit Guineagrün B einmal eine ganz schwache Granulafärbung erhalten zu haben. Man sieht also, daß es meistens nicht gelingt, bei den nicht kolloidalen Farben eine Aufspeicherung in Granula zu beobachten.

β) Hydrophil-kolloidale F.: Das Resultat dieser Versuche sei vorangestellt: alle drei verwendeten hydrophil-kolloidalen Farbstoffe, Trypanrot, Diaminreinblau und Trisulfonblau B, und beide halb-hydrophile, Säureviolett 6B und wasserlösliches Anilinblau, bildeten reichlich dunkelgefärbte Granula in den Nierenzellen. Ich führe ein paar Protokolle an:

Trypanrot (1 % in Wasser): Einem Kaninchen in 30 Minuten 15 ccm in die Vena jugularis. Nach 24 Stunden getötet. Niere: In der Rinde viele ziemlich große, rote Granula, aber nicht überall, sondern nur fleckenweise in einzelnen Gruppen von Tubuli contorti. Granula teils unregelmäßig über die Zellen verstreut, teils nur am Innensaum. Färbung scharf gegen die farblose Marksubstanz abgesetzt. Glomeruli farblos. Epithelien der Bowmanschen Kapsel farblos.

Trisulfonblau B (in Wasser): Einer Maus 1 ccm subcutan. Nach 16 Stunden starb das Tier. Haut und innere Organe hellblau. Blase eer. Niere: Fleckige Blaufärbung der Rinde, Mark schwach grünlichblau. Glomeruli grünlichblau, daran anschließend viele Kanäle durch dunkelblaue Granula, einschließlich der Bowmanschen Kapsel gefärbt. Aber auch viele Kanäle farblos.

γ) Suspensionskolloidale F.: Diese verhielten sich sehr variabel; ein Teil von ihnen färbt nach meinen bisherigen Erfahrungen gar nicht, weder die Niere von Mäusen noch die von

Kaninchen; andere färben lokalisiert, aber diffus, und dritte geben Granulafärbung.

Gar nicht färben: Diamingrün B, Azoblau, wasserlösliches Nigrosin und Kongokorinth G. Dabei war in diesen Versuchen der Gefäßinhalt auffallend stark gefärbt. Folgendes Protokoll ist typisch:

Diamingrün B (in Wasser): Einer Maus wird 1 ccm injiziert, nach 24 Stunden noch 1 ccm, nach weiteren 3 Stunden noch 1 ccm; 20 Minuten danach getötet. Niere: in der im übrigen farblosen Rinde fallen die hellgrasgrünen Glomeruli auf. Marksubstanz teilweise grün, sicher durch den grünen Inhalt der Capillaren, ob auch durch Epithelfärbung, ist ungewiß.

Diffusfärbung erhielt ich mit Croceinscharlach 7 B und Biebricher Scharlach, z. B. in folgender Weise:

Croceinscharlach 7 B: Einer Maus 1 ccm injiziert. Nach 30 Minuten Ohren gerötet. Nach $2^1/_2$ Stunden getötet. In der Blase rosa Harn. Niere: einzelne Tubuli contorti diffus rosa, ebenso Glomeruli. Mark diffus rosa, stärker gefärbt als die Rinde.

Kongorot, Bayrisch Blau und Afridolblau endlich sammelten sich in lebhaft gefärbten Granula in der Rinde an; z. B.:

Bayrisch Blau (in Kochsalzlösung): Einer Maus 1 ccm injiziert. Nach 2 Stunden Ohren schwach blau. Nach 6 Stunden noch 1 ccm, nach einer weiteren Stunde getötet. Blase enthält blauen Harn. Niere: Starke Bläuung der Rinde, dadurch, daß einzelne Tubuli contorti von großen blauen Granula besetzt sind, während dazwischen liegende Tubuli ganz ungefärbt sind. Die ebenfalls gefärbten Bowmanschen Kapseln umfassen als blaue Trichter die farblosen Glomeruli. Die Granula sind reihenförmig am Innensaum der Zellen angeordnet. Mark bis auf die hellblaue Papilla renalis farblos.

Hiernach verhalten sich die suspensionskolloidalen Farbstoffe etwa so, wie wir es bei den Fröschen schon kennen gelernt haben. Dieselben Farben, welche dort gar nicht färbten, färben auch die Säugerniere nicht, und dieselben, welche trotz ihrer Suspensionsnatur dort färbten, färben auch hier.

So weit reichen die bisherigen Erfahrungen. Da sie nicht sehr zahlreich sind, so halte ich es für möglich, daß sie hier und da noch einer Korrektur unterliegen werden, d. h. daß mit dieser oder jener Farbe noch Granulafärbung erzielt wird, wo es mir bis jetzt nicht geglückt ist. Auf alle Fälle scheinen mir aber doch die Versuche jetzt schon zu beweisen, daß

erstens auch die Säugerniere durch viele Säurefarbstoffe lokalisiert zu färben ist, daß also andere Farbstoffe ebensogut die Tätigkeit der Niere zum Ausdruck bringen können als immer nur Carmin und indigoschwefelsauresNatron, welch letzteres, wenigstens infolge seiner leichten Reduzierbarkeit, nicht einmal besonders günstig ist; und zweitens beweisen die Versuche wohl, daß manche Farbstoffgruppen zur granulären Färbung der Niere extra geeignet sind, nämlich die hydrophil-kolloidalen Farben, zu denen ja auch das von Brugnatelli untersuchte Benzoblau 3 B gehört (s. S. 86). Ob das darauf beruht, daß diese Farben relativ langsam von der Blutbahn durch die Zellen in die Harnorgane übertritt, so daß man relativ leicht die richtige Zeit für die Untersuchung abpaßt, vermag ich jetzt nicht zu entscheiden.

Auf alle Fälle kann ich in den vorhandenen Resultaten eine Bestätigung der an der Froschniere gesammelten Erfahrungen erblicken.

D. Die Färbbarkeit der Froschleber.

P. Ehrlich hat schon vor längerer Zeit eine Ansicht über die Verteilung der Farbstoffe geäußert, welche sich mit dem hier bisher Erörterten eng berührt, und auf welche er mich gelegentlich eines Gesprächs hinwies. In einem 1898 gehaltenen Vortrag[1]) sagte er folgendes: „Nierenrinde, Leber und Darm sind wohl die Hauptstätten der Elimination (der Farbstoffe). Im Gegensatz zu der überwiegenden Mehrzahl der Farbstoffe, die, wie Methylenblau, Fuchsin, Alizarin, Indigcarmin und noch viele andere, besonders leicht in das Harnsekret übertreten, gibt es einige, die hierzu nicht befähigt erscheinen und welche daher vorwiegend durch die Galle resp. mit dem Darmsaft zur Ausscheidung gelangen. Ein solcher Farbstoff ist z. B. das Benzopurpurin, ein hochmolekularer Baumwollfarbstoff. (Anmerkung: Es ist möglich, daß diese Erscheinung ausschließlich durch den Umstand erklärt wird, daß es sich hier um schwer lösliche und hochmolekulare Substanzen handelt, denen ein mehr kolloidaler Charakter vindiziert werden muß. So ist das Benzopurpurin im Gegensatz zum Methylenblau, Methylviolett und vielen anderen Farbstoffen absolut nicht diffusionsfähig . . .)

[1]) Siehe Festschrift für Leyden, 1.

Aber man wird auch daran denken können, daß analoge Farbstoffe außerdem mit dem Bluteiweiß eine lockere Verbindung eingehen, welche die Ausscheidung durch die Niere unmöglich macht. Es würden also dann analoge Verhältnisse vorkommen, wie wir sie bei vielen Metallen, z. B. dem Eisen oder Blei, kennen, und wie sie bei der Ausscheidung eines giftigen Eiweißstoffes, des Ricins, durch die Untersuchungen des Pasteurschen Instituts festgestellt worden sind. Da, wie bekannt, das Eiweißmolekül das intakte Nierenfilter nicht zu passieren vermag, werden eben alle Substanzen, die als Albuminverbindungen in der Zirkulation auftreten, nicht in den Urin übergehen. Dagegen sind die Darmdrüsen resp. die Leber befähigt, auch diese hochkomplizierten Substanzen passieren zu lassen."

Wenn wir den Kern dieser Sätze herausschälen, so besagen sie: 1. diejenigen Farbstoffe, welche nicht in den Harn übergehen, sind wahrscheinlich kolloidal gelöst; 2. dieselben Farbstoffe werden durch Galle bzw. Darmsaft ausgeschieden, weil Leber und Darm im Gegensatz zur Niere kolloidalen Substanzen den Durchtritt gewähren.

Man sieht, wie Ehrlich hier, wie schon einmal beim Thema der Farbstoffverteilung, ganz kurz seine Eindrücke über die Natur dieser Verteilung skizziert hat, und wie sich dann nachträglich, bei der genaueren experimentellen Durchforschung des Gebietes, die zwar nicht durchgehende, aber doch weit reichende Bestätigung seiner Ansicht ergibt. Denn daß die Kolloidität in der Tat eine Rolle für die Farbaufnahme von seiten der Niere spielt, ist ja im Vorangegangenen gezeigt worden.

Es ergab sich da freilich, daß es auch kolloidale Farben gibt, welche durch die Niere passieren. Aber da andrerseits wirklich viele kolloidale Farben durch die Niere nicht hindurch können, so legt die von P. Ehrlich geäußerte Ansicht nun wenigstens für diese die Erklärung nahe, daß sie dann die Niere vielleicht nur deshalb nicht passieren, weil sie schon von Leber und Darm abgefangen und eliminiert werden. So wenig wahrscheinlich das danach, was über den Verbleib kolloidaler Farben im Gefäßsystem schon gesagt wurde (s. S. 86 u. 89), auch ist, so habe ich doch, zumal da über die Färbbarkeit der Leber fast nichts bekannt ist, noch einige Versuche hierüber angestellt.

Ich habe hauptsächlich Fröschen Farbstoffe verschiedener Kolloidität und von verschiedenem Verhalten gegen die Niere teils in den Rückenlymphsack, teils direkt in die Blutbahn gebracht, und dann nach 1 bis 2 Tagen die Leber in Gefrierschnitten frisch untersucht. Geprüft wurden:

1. Farbbasen: Neutralrot, Bismarckbraun.

2. Säurefarbstoffe:

a) nicht kolloidale: Indigcarmin, Brillantcrocein 3 B, Coccinin;

b) hydrophil-kolloidale: Benzoreinblau, Trypanrot, Trisulfonblau 3 B, Benzoblau 2 B und 3 B, Benzodunkelgrün;

c) mehr oder weniger suspensionskolloidale: α) welche die Niere passieren können: Echtrot A und B, Bayrisch Blau, Afridolblau, Azofuchsin GN extra; β) welche die Niere nicht passieren: Diamingrün B, Kongobraun, Benzopurpurin 4 B, Indulin, Benzonitrolbraun.

Ohne auf Einzelheiten einzugehen, will ich die Ergebnisse kurz zusammenfassen: Nur in einem einzigen Falle erhielt ich eine deutliche und ausgiebige Färbung der Gallengangscapillaren als Zeichen einer Ausscheidung der Farbe durch die Leber, und das war nach Einverleibung von Indigcarmin, welches ja seit langem dazu dient, die Gallengänge sichtbar zu machen. Ein einigermaßen ähnliches Bild gab bloß noch Azofuchsin GN extra; nach dessen Zufuhr sah man in der nächsten Umgebung der großen Blutgefäßstämme das Lebergewebe diffus rosa gefärbt und auf dem rosa Grunde dunkelviolette, scharf konturierte, kurze oder etwas längere, geknickte, auch etwas verzweigte Striche, welche dem bekannten Bilde der mit Indigcarmin gefällten Gallengangscapillaren ähnlich waren; das übrige Lebergewebe erschien farblos. Alle anderen Farben gingen nicht in die Gallenwege über. In diesen Fällen sah man vielmehr die Farbe in den Blutgefäßen verteilt. Dadurch kam meist ein grobmaschiges gefärbtes Netz zum Vorschein, dessen breite Fäden, ganz unscharf gegen die Umgebung abgesetzt, sich aus großen und kleinen durchsichtigen Farbmassen zusammensetzten; dies war offenbar das gefärbte Blutcapillarnetz, das sich von dem zierlichen, aus feineren und zugleich scharf gezogenen Strichen bestehenden Gallencapillarnetz der Indigcarmin-Versuche deutlich unterschied. Aber das Blutcapillar-

netz war, je nach der Menge des jeweilen eingelagerten Farbstoffes, bald auffallend gut, bald nur verschwommen sichtbar. Besonders lebhaft trat es hervor nach Einverleibung von Kongobraun, Diamingrün B, Benzopurpurin 4 B und Indulin, während es bei den anderen Farben gewöhnlich viel weniger deutlich war. Es sind also gerade diejenigen hochkolloidalen Farben, welche die Niere nicht aufzunehmen vermag, die dann in den Leberschnitten besonders gut sichtbar werden, aber nicht als Produkte der Ausscheidung im Gallencapillarnetz, sondern angehäuft im Blutcapillarnetz und anscheinend nicht aus ihm zu beseitigen.

Meine Versuche geben also keine Anhaltspunkte für die von Ehrlich geäußerte Meinung, daß die hochkolloidalen Farben durch die Leber eliminiert werden. Vielmehr erscheint mir bisher die Leber ganz auffallend wenig befähigt, Farbstoffe zu transportieren; allein das Indigcarmin konnte passieren, derselbe Farbstoff, der zwar nach meinen Erfahrungen den Nierenzellen gegenüber nicht die ihm so oft eingeräumte Vorzugsstellung einnimmt, aber, wenigstens vorläufig noch, als der einzige für den Eintritt in die Speicheldrüsenzellen geeignete Farbstoff gilt.

Nach alledem darf es wohl als erwiesen gelten, daß es für das Aufnahmevermögen der Nierenzellen mit auf die physiko-chemische Eigenschaft der Kolloidität ankommt, und wenn damit auch nur die an einem Organ gewonnenen Erfahrungen in einen allgemeinen Satz zusammengefaßt werden, so ist es doch vielleicht berechtigt, zu folgern, daß die Kolloidität erstens auch beim Import anderer Zellen und zweitens beim Import anderer Stoffe als bloß der Farbstoffe eine Rolle spielt. Der erste Schluß könnte eine gewisse Bedeutung für die von P. Ehrlich inaugurierten, modernen farbentherapeutischen Studien gewinnen, insofern als die leicht auszuführende Orientierung über den kolloidalen Charakter der Farben möglicherweise die bisher recht mühsame Auffindung zur Therapie geeigneter Stoffe erleichtern könnte; der zweite Schluß könnte der Definierung von pharmakologischer und toxikologischer Wirksamkeit im allgemeinen zugute kommen.

Zusammenfassung der Hauptergebnisse.

1. Wenn auch nach den bisherigen Erfahrungen im allgemeinen der von Overton aufgestellte Satz, daß die Vitalfarben lipoidlöslich, die Nichtvitalfarben lipoidunlöslich sind, richtig ist, so ist doch unverkennbar, daß es einige Ausnahmen von diesem Satze gibt. So sind Methylengrün, Methylgrün Krystalle I, Malachitgrün und Thionin in Lipoiden schwer oder unlöslich und färben doch Spirogyren leicht intravital; andererseits sind Echtrot A, Tuchrot 3 GA, Cyanosin, Erythrosin und Rose bengale lipoidlöslich und färben dennoch die Spirogyren nicht. Auf diese Widersprüche mit der Lipoidtheorie hat zumeist schon Ruhland hingewiesen. Dieselben Widersprüche ergeben sich bei Versuchen über die vitale Färbbarkeit der Darmepithelien vom Frosch und der Blutkörperchen vom Feuersalamander.

2. Die Widersprüche mit der Lipoidtheorie sind aber nicht so zahlreich, wie Ruhland angibt. Insbesondere ist bisher kein sicherer Fall bekannt, in dem eine lipoidlösliche Farbbase nicht intravital färbt, und nur ein einziger Fall, in dem ein Sulfosäurefarbstoff trotz Lipoidlöslichkeit nicht färbt. Die der Lipoidtheorie widersprechenden Säurefarbstoffe sind fast durchweg keine Sulfosäurefarbstoffe.

3. Fast durchweg entspricht den Tatsachen besser als die Overtonsche Beziehung zur Lipoidlöslichkeit der Satz, daß basische Farbstoffe Vitalfarben und Säurefarbstoffe Nichtvitalfarben sind.

4. Die Nierenepithelien sind weitgehend befähigt, auch Säurefarbstoffe aufzunehmen. Diese Fähigkeit ist aber von gewissen Graden der Kolloidität der Farben abhängig; dies ergibt sich aus folgenden Erfahrungssätzen:

a) Wenn ein Farbstoff wenig bzw. nicht kolloidal ist, so wird er von den Nierenzellen leicht aufgenommen;

b) wenn ein Farbstoff hydrophil-kolloidal ist, so wird er ebenfalls leicht aufgenommen;

c) wenn ein Farbstoff von den Nierenzellen schwer oder nicht aufgenommen wird, dann ist er suspensionskolloidal.

5. Die Niere von Säugetieren verhält sich anscheinend ebenso wie die Froschniere. Auch sie vermag viele Farbstoffe

in die Epithelien ihrer Tubuli contorti aufzunehmen; nur gegenüber einigen suspensionskolloidalen Farbstoffen versagt ihre Importfähigkeit.

6. Die Leber vom Frosch ist nicht dazu befähigt, besonders die hochkolloidalen Farbstoffe zu eliminieren. Der einzige Farbstoff, dessen Übergang in die Gallenwege mit Sicherheit zu konstatieren ist, ist das Indigcarmin.

Über die Einwirkung des Bacillus bulgaricus auf verschiedene Zuckerarten.

Von

G. Bertrand und Fr. Ducháček.

(Aus dem Laboratorium für biologische Chemie an der Sorbonne in Paris, Institut Pasteur.)

(Eingegangen am 30. Juni 1909.)

Wird die Mikrobe aus „Yoghurt" oder geronnener bulgarischer Milch in sterilisierte Kuhmilch eingetragen, so entwickelt sich dieselbe sehr rasch und verbraucht in einigen Tagen fast die ganze Menge vorhandener Lactose.

Wie einer von uns, unter Mitwirkung G. Weißweilers[1]), nachgewiesen hat, verläuft der Prozeß folgendermaßen: Durch den Einfluß eines stark wirksamen Enzymes, das bis jetzt noch nicht isoliert ist, wird zunächst die Lactose in Glucose und Galactose hydrolysiert, welche dann in ein Gemisch von links- und rechtsdrehender Milchsäure übergehen, worin die rechtsdrehende Säure vorherrscht.

Neben diesen Milchsäuren, deren Menge verhältnismäßig eine hohe Konzentration erreichen kann — 25 g pro Liter — bildet sich noch eine kleine Menge (0,5 g) Bernsteinsäure, ferner fast ebensoviel Essigsäure und schließlich eine ganz kleine Menge Ameisensäure.

Zum Unterschiede von anderen Mikroben wurde hierbei nicht die Bildung von Alkohol, Aceton, Acetylmethylcarbinol[2]) ($CH_3 . CO . CHOH . CH_3$) und 2,3-Butylenglykol ($CH_3 . CHOH . CHOH . CH_3$) konstatiert.

---

[1]) Annales de l'Institut Pasteur 20, 977, 1906; Annal. d. Chem. 351, 486, 1906.

[2]) Siehe: Harden und Walpole, Proceedings of the Royal Society 77, 399, 1906.

Der Bacillus bulgaricus zeichnet sich in biochemischer Hinsicht durch seine hochgradige Gärkraft und durch die Einfachheit der Umwandlungen aus, denen die Lactose unter seinem Einflusse unterliegt, und hierbei ist namentlich die Umwandlung bemerkenswert, die mit der Bildung der Milchsäure im Zusammenhange steht. Auf Grund dessen kann man das bulgarische Ferment als den geeignetsten Typus zum Studium der Milchsäuregärung anerkennen, jener überaus wichtigen, natürlichen Art der Zuckerspaltung, welche gleichzeitig bei vielen Mikrobenarten und bei einer großen Anzahl von Tieren aller Art beobachtet wurde.

Vorläufig ist es uns unmöglich, eine stichhaltige Theorie für die Transformation der Glucose oder eines analogen Zuckers in Milchsäure, sei es durch Einfluß lebendiger Zellen oder durch Einwirkung von chemischen Reagenzien, anzuführen. Wir wissen nur, daß einige Zuckerarten dieser Umwandlung verfallen; die Beziehungen aber zwischen der Konstitution oder der stereochemischen Struktur dieser Zucker und der Leichtigkeit, mit welcher sie in Milchsäure oder in eine bestimmte Modifikation derselben übergehen, wurden bis jetzt nicht eingehend studiert. Nur dann, wenn wir jenen Zusammenhang und die Serie der Zwischenprodukte, welche diese Transformation begleiten, kennen werden, wird es uns möglich sein, uns eine genaue Vorstellung des Glykolyseprozesses zu bilden, welchen die Milchsäurebacillen mit so bemerkenswerter Reinheit durchzuführen vermögen, um ihren Bedarf an Energie zu decken. Wir vermuteten, daß eine vergleichende Studie, die sich mit der Einwirkung des bulgarischen Ferments auf die allerwichtigsten Repräsentanten der Zuckergruppe befaßte, dahin führen werde, uns einen nützlichen Beitrag zur Kenntnis der Milchsäuregärung zu liefern. Die in dieser Richtung von uns unternommenen Versuche bilden den Gegenstand der vorliegenden Abhandlung.

Wahl der Nährboden.

Im Arbeitsprogramme wurde festgesetzt, die Mikroben auf eine Reihe von Zuckern, die einzeln in die Nährsubstrate eingetragen wurden, einwirken zu lassen, um sodann die durch die Mikroben hervorgerufenen Umwandlungen zu unter-

suchen; es war aber nicht möglich, an die Verwendung der Milch als Nährmedium bei ihrem bedeutenden und nicht entfernbaren Gehalt an Lactose zu denken. Ebenso waren wir genötigt, alle jene natürlichen und künstlichen Nährböden auszuschließen, die allerhand Zucker in wägbaren Mengen enthalten.[1])

Wir suchten in erster Linie zuckerfreie Nährsubstrate. Nach zahlreichen Versuchen gelang es uns, schließlich einen vorzüglichen Nährboden zu finden, in welchem die Mikroben gerade so gut gedeihen wie in der Milch. Wir empfehlen diese Lösung wärmstens zum Studium des Bacillus bulgaricus und zur Bereitung von Kulturen für therapeutische Zwecke.

Den Nährboden gewannen wir aus einem Absude von Malzkeimen, der durch viertelstündiges Kochen von 30 g Malzkeimen in einem Liter Wasser[2]) bereitet wurde, wozu ein Zusatz von 1°/₀ Pepton und 3°/₀ gefällten kohlensauren Kalkes gemacht wurde. Wenn wir nun in dieser Flüssigkeit 2 bis 4°/₀ Lactose oder eine von den unten angeführten vergärbaren Zuckerarten lösen, resultiert ein Nährboden, in welchem die Mikrobe sich rasch entwickelt und dabei ihre biochemische Wirkung gänzlich beibehält. Wir betonen den letzterwähnten Umstand als sehr wichtig, denn es bestehen viele Nährsubstrate, in denen sich die Mikrobe, nach äußerem Aussehen der Kultur oder nach der mikroskopischen Untersuchung zu urteilen, zwar gut entwickelt, die sich aber als unzureichend erweisen, wenn die Gärung durch die chemische Analyse verfolgt wird. Unsere Versuche haben wir mit Nährlösung von oben angeführter Zusammensetzung angestellt.

Wir erwähnen als Beleg auch die anderen der Untersuchung unterzogenen Nährböden, und zwar in einer Reihenfolge, entsprechend ihrem Nährwerte, die Milch inbegriffen, welche als Maßstab zum Vergleich herangezogen wurde.

Vorzügliche Nährböden:

Milch mit kohlensaurem Kalk;

Milch allein;

oben erwähntes Nährmedium;

---

[1]) Z. B. Nährboden, welchen Cohendy empfiehlt.

[2]) Lösung, welche beiläufig 12 g mineralische und organische Substanzen enthält.

Malzextrakt (vielmehr Süßwürze), hergestellt nach Cohendys Vorschrift mit Zusatz von Pepton[1]), kohlensaurem Kalk und Lactose.

Genügend gute Nährböden:

Hefeabsud[2]) mit Pepton, kohlensaurem Kalk und Lactose;

Linsenabsud[3]) mit Zusatz derselben Stoffe.

Schlechte Nährböden:

Milchserum[4]) mit Zusatz von kohlensaurem Kalk;

Süßwürze mit alleinigem Zusatze von kohlensaurem Kalk;

Absud von Malzkeimen, Hefe oder Linsen mit Zusatz von Pepton und Lactose, aber ohne kohlensauren Kalk;

Milchserum mit Pepton, aber ohne kohlensauren Kalk;

Absud von Zwiebeln[5]) oder Bohnen[6]) mit Zusatz von Pepton, Lactose und kohlensaurem Kalk;

Urin, ebenfalls mit Zusatz von Pepton, Lactose und kohlensaurem Kalk.

Die mikroskopische Untersuchung der in allen diesen Nährböden gezüchteten Kulturen ergab, daß die Länge der Mikroben und ihr Durchmesser bei weitem geringer ist in den schlechten als in den guten Nährböden und daß die Länge bis zur Hälfte des ursprünglichen Wertes reduziert werden kann. Außerdem verhält sich der schlecht entwickelte Bacillus bulgaricus, bei Färbung nach Gram, geradeso wie eine alte Kultur, indem er den Farbstoff nur schwer oder überhaupt nicht aufnimmt.

Einwirkung des Bacillus bulgaricus auf nicht hydrolysierbare reduzierende Zuckerarten.

Die Zucker, die zum Studium gewählt wurden, gehören den drei Hauptgruppen an: 1. nicht hydrolysierbare reduzierende

---

[1]) Ohne Pepton ist dieser Nährboden etwas weniger günstig.

[2]) Mit 5 % Extrakt.

[3]) 1 Teil Linsen und 5 Teile Wasser 1/4 Stunde gekocht; enthält 1,81 % Extrakt.

[4]) Bereitet nach Cohendy.

[5]) 100 g Zwiebeln und 400 g Wasser 1/4 Stunde gekocht.

[6]) Wie bei der Linse (1,51 % Extrakt).

Zucker; 2. Zuckerarten, die sich hydrolysieren lassen und 3. reine Kohlenhydratalkohole.

Von Zuckern der ersten Gruppe wurden der Untersuchung unterzogen zwei Pentosen: Arabinose und Xylose und fünf Hexosen: Glucose, Mannose, Galactose, Fructose und Sorbose.

Die Nährlösung mit 2 oder 4% absolut reinem Zucker und 1% Pepton wurde immer auf einmal für eine größere Anzahl der Versuche vorbereitet; von dieser Lösung wurden sodann in jedes Reagensglas genau je 10 ccm abgemesen und eine abgewogene Menge von 300 mg kohlensaurem Kalk zugetan. Nach viertelstündiger Sterilisation bei 120° wurde die Lösung mit einer sehr aktiven und bei 32° gezüchteten Milchkultur geimpft und in einem Thermostaten bei derselben Temperatur gestellt.

Um konstatieren zu können, ob der Zucker vergor oder nicht, wurde der Inhalt eines Reagensglases filtriert, der Niederschlag gewaschen, der ungelöst gebliebene kohlensaure Kalk und der unvergorene reduzierende Zucker bestimmt.[1])

Das Reduktionsvermögen wurde nach der von einem[2]) von uns beantragten Methode bestimmt. Führte die Mikrobe die Gärung herbei, so entsprach die durch die gebildete Milchsäure gelöste Calciumcarbonatmenge theoretisch der Quantität des verbrauchten reduzierenden Zuckers. Umgekehrt, falls die Gärung nicht stattgefunden hat, wurde die Gesamtmenge des Kalksalzes sowie auch der ganze, in das Nährsubstrat eingebrachte reduzierende Zucker wiedergefunden.

Die erste Versuchsreihe ergab, daß von den angeführten Zuckern: Arabinose, Xylose und Sorbose nicht gärfähig sind. So wurde gefunden:

	Zucker mg	$CaCO_3$ mg
Bei Arabinose:		
Kontrollversuch	178	284
Kultur nach 2 Tagen . . .	176	286
„ „ 10 „ . . .	178	288
Bei Xylose:		
Kontrollversuch	179	289

[1]) War die Lösung sauer, so wurde sie auch titriert.

[2]) G. Bertrand, Bull. de la Soc. Chim. de Paris 1906.

Bei Xylose:	Zucker mg	$CaCO_3$ mg
Kultur nach 2 Tagen . . .	179	287
„ „ 10 „ . . .	174	284
Bei Sorbose:		
Kontrollversuch	183	285
Kultur nach 2 Tagen . . .	185	283
„ „ 10 „ . . .	179	282

Demgegenüber verschwinden in $4^0/_0$iger Lösung leicht die Glucose, Mannose, Galactose und Fructose und werden in Säuren übergeführt. Am raschesten, das ist nach 4 Tagen, vergären die Glucose und Galactose, d. h. jene Zucker, die durch Hydrolyse des Milchzuckers resultieren; die Mannose schwindet[1]) fast mit der halben Schnelligkeit (in 9 Tagen), und die Lävulose widersteht der Einwirkung der Mikrobe am längsten, denn nach $1^1/_2$ Monaten verblieb noch ein Viertel Zucker unvergoren.

Nachdem wir diese Grunddaten festgestellt hatten, schritten wir zu Detailversuchen über die Einwirkung des bulgarischen Ferments auf die vier genannten vergärbaren Zucker, wobei mit größeren Mengen Substanz gearbeitet wurde, um die einzelnen Produkte der Gärung trennen und genau bestimmen zu können. Zu den Versuchen mit Glucose, Galactose und Fruchtzucker nahmen wir je 600 ccm Malzkeimabsud, 6 g Pepton, 10 g kohlensauren Kalk und 20 g Zucker, wogegen bei Mannose aus Sparsamkeitsgründen nur ein Drittel der oben angeführten Menge genommen wurde. Es wurde bei 115 bis 120° eine Viertelstunde sterilisiert, später geimpft und die Kulturen nach 9 Tagen bei Glucose, nach 16 Tagen bei Galactose und nach 18 Tagen bei Fructose der chemischen Untersuchung unterzogen.

Die Analyse wurde nach folgender Methode durchgeführt: Die Kultur wurde auf dem Wasserbade erwärmt und der kohlensaure Kalk aus derselben mit der genau entsprechenden Menge Oxalsäure gefällt. Sodann wurde filtriert, der Niederschlag gewaschen und das Filtrat im Vakuum zur Sirupkonsi-

---

[1]) Wenn reichlich geimpft; im entgegengesetzten Falle entwickelt sich die Mikrobe gar nicht oder nur sehr langsam.

stenz eingedampft; das Destillat enthielt die flüchtigen, der Sirup die nichtflüchtigen Produkte.

Analyse der flüchtigen Bestandteile. Das Destillat wurde mit Barytwasser titriert und der Befund auf Essigsäure berechnet. Es wurde gefunden: bei Glucose 0,277 g, bei Galactose 0,220 g, bei Fruchtzucker 0,220 g und bei Mannose 0,117 g.

Die Lösung der Bariumsalze wurde im Vacuum auf 25 ccm eingeengt; von dieser Lösung wurden 5 ccm mit Silbernitrat gekocht, um das Formiat zu vernichten, das durch Reduktion gebildete Silber durch Filtration abgetrennt und das Filtrat konzentriert. Das essigsaure Silber krystallisiert, und dessen Identifikation wurde durch Überführung in Äthylacetat vervollständigt.

Die verbliebenen 20 ccm der Bariumlösung wurden bis auf 1 ccm abgedampft, und nach Zugabe einiger Tropfen der gesättigten Lösung von normalem Bleiacetat wurde das Gemisch bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Sodann wurden die Krystalle des ameisensauren Bleies gewogen, und man fand:

bei Glucose .	0,035 g;	dem	entspricht	0,011 g	Ameisensäure.
„ Galactose .	0,046 g;	„	„	0,014 g	„
„ Lävulose .	0,022 g;	„	„	0,007 g	„
„ Mannose .	nur einige mg.				

Es wurden außer Essig- und Ameisensäure keine weiteren flüchtigen Produkte gefunden, es verläuft demnach die Gärung in der Richtung wie bei der Milch.

Analyse der nicht flüchtigen Bestandteile. Der stark sauer reagierende Sirup wurde 6mal nacheinander mit je 250 ccm Äther extrahiert, die Ätherlösungen wurden filtriert und destilliert. Der Rest wurde nach der Destillation nochmals im Wasser gelöst, mit einem kleinen Überschusse des Barytwassers neutralisiert und nach kurzem Stehen das überschüssige Bariumhydrat mit Kohlendioxyd ausgefällt, sodann wurde im Vakuum eingekocht, um das Bariumbicarbonat zu zersetzen, filtriert und mit einer gerade ausreichenden Menge 10%iger Zinksulfatlösung gefällt. Schließlich wurde das schwefelsaure Barium durch Filtration abgetrennt und die Zinksalzlösung durch Destillation eingeengt: bei Glucose auf etwa 100 ccm, bei Galactose auf ungefähr 110 ccm, bei Lävulose auf ca. 95 ccm und bei Mannose auf etwa 20 ccm.

Nach 24 Stunden wurden die Krystalle abgesaugt und mit einer kleinen Menge Wasser gewaschen (2mal ungefähr mit je 5 ccm). Nach der neuerdings erfolgten Konzentration auf ca. 10 ccm erfolgte dann die zweite Krystallisation. Das Gewicht der beiden Fraktionen (bei 30° getrocknet) betrug:

	bei Glucose	Galactose	Lävulose[1])	Mannose
	g	g	g	g
I. Krystallisation . .	20,38	11,61	9,87	4,33
II. „ . .	4,74	6,23	1,26	1,07

Die Krystalle der ersten und zweiten Krystallisation bestanden bei den vier genannten Zuckerarten aus racemischem Zinklactat; ihre konzentrierten wässerigen Lösungen ergaben in einem 50 cm langen Rohre keine Ablenkung der Polarisationsebene; die Bestimmungen des Wassers (bei 105°) und des Zinkoxydes (durch Calcinieren) lieferten nachstehende Daten:

Wasser in %:	aus Glucose	Galactose	Lävulose	Mannose
	g	g	g	g
bei I. Krystallisation .	18,20	18,20	18,08	18,16
„ II. „ .	17,66	17,80	17,20	17,96
ZnO in %:				
bei I. Krystallisation .	22,05	22,03	22,08	21,99
„ II. „ .	22,22	22,02	22,10	22,01

Diese Daten stimmen vollständig mit der Zusammensetzung des racemischen Lactates, welches 18,18% Wasser und 21,89% ZnO enthält, wogegen die aktiven Lactate 12,90% Wasser und 23,30% ZnO verlangen.

In den Mutterlaugen von den Zinklactaten fanden wir kleine Mengen Bernsteinsäure. Zum Nachweise derselben haben wir zu diesen Laugen kleine Menge Schwefelsäure zugesetzt und mit Äther (4mal mit je 50 ccm) extrahiert. Der Äther löst die Bernsteinsäure und den Rest der Milchsäure heraus. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der zurückbleibende Sirup der Krystallisation überlassen. Nach 1 bis 2 Tagen wurden die Krystalle abgetrennt, mit einer kleinen Menge Äther gewaschen und schließlich aus 1 oder 2 ccm Wasser umkrystallisiert.

[1]) Lävulose vergor nicht gänzlich; nach dem Reduktionsvermögen verblieb noch 5,2 g Lävulose zurück.

Das Gewicht der so gewonnenen Bernsteinsäure betrug: bei Glucose 0,049 bei Galactose 0,059 g, bei Lävulose 0,108 g und bei Mannose 0,069 g.

Die Reinheit der Bernsteinsäure wurde durch die Bestimmung des Schmelzpunktes und des Molekulargewichtes kontrolliert. Der Schmelzpunkt, mit dem Maquenneschen Prisma ermittelt, betrug 187 bis 188°; das Molekulargewicht, aus der Titration mit dezinormaler Lauge berechnet, betrug: bei der Bernsteinsäure aus Glucose 118,5, aus Galactose 119,7, aus Fruchtzucker 118,6 und aus Mannose 119,3. Theorie: 118.

Schließlich wurde bewiesen, daß die Krystalle bei stärkerem Erwärmen weiße Dämpfe von stechendem Geruch entwickeln und daß ihre neutrale Lösung mit Ferrichlorid den charakteristischen roten Niederschlag des Ferrisuccinats liefern.

Die Untersuchung der nichtflüchtigen Produkte ergab daher, daß durch die Milchsäuregärung der Hexosen auf künstlichem Nährboden gebildet werden: 1. d- und l-Milchsäure in genau gleichen Mengen, 2. ein kleiner Anteil von Bernsteinsäure. Qualitativ sind es dieselben Produkte, die man bei der Gärung von Milch erhält. Quantitativ ist aber eine gewisse Differenz wahrzunehmen, derart, daß im natürlichen Nährboden mehr d- als l-Milchsäure sich bildet; anstatt des racemischen Zinksalzes, welches die Polarisationsebene nicht beeinflußt, erhielten wir ein Salz, welches ein Drehungsvermögen besitzt und beträchtlich linksdrehend ist.[1]) Was kann die Ursache dieser Differenz sein? Wir können nicht den Zucker dafür verantwortlich machen, denn in der Milch wird zuerst die Lactose durch die Mikroben in ein Gemenge von Glucose und Galactose gespalten; eher läßt sich dies durch das Nährsubstrat erklären. Das Studium der Gärung, der die hydrolisierbaren Zucker anheimfallen, wenn man sie im Malzkeimextrakte neben Pepton löst, wird in dieser Hinsicht die richtige Aufklärung bringen.

Einwirkung des bulgarischen Ferments auf hydrolysierbare Zuckerarten.

Von dieser Gruppe wurden einer Untersuchung unterzogen: zwei reduzierende Zucker: Lactose und Maltose, und eine nicht

[1]) Es ist bekannt, daß die Zinksalze in umgekehrtem Sinne die Polarisationslichtebene ablenken wie die betreffenden Säuren.

reduzierende Zuckerart: Saccharose. Unter diesen 3 Zuckerarten ist nur die Lactose vergärbar, wogegen die beiden anderen der Einwirkung der Mikrobe vollständig widerstehen, wie aus den nachfolgenden Angaben zu ersehen ist.

Saccharose. Es wurden 2 Versuchsserien angestellt. In der ersten Reihe enthielt jedes Reagensglas 10 ccm Malzkeimextrakt, 1% Pepton, 4% Zucker und 0,3 g kohlensauren Kalk. In der zweiten Serie wurde der Malzkeimabsud durch Hefeextrakt ersetzt. Die Sterilisation und die Kulturen wurden ähnlich wie bei den anderen Zuckerarten angeordnet.

Nach Herausnahme aus dem Thermostaten wurde die Nährlösung filtriert und der gewaschene Niederschlag mit Salzsäure titriert, um festzustellen, welche Menge kohlensauren Kalks noch vorhanden ist; es wurde die ganze zugesetzte Menge des kohlensauren Kalkes wiedergefunden. Das Filtrat, welches auch keine saure Reaktion besaß, wurde auf 50 ccm gebracht und davon ein Teil zur Bestimmung des Reduktionsvermögens verwendet, welche jedoch ein negatives Resultat lieferte. Es wurden daher 20 ccm abgemessen und nach Zugabe von 1 ccm konzentrierter Salzsäure behufs Hydrolyse des Zuckers auf dem Wasserbade erhitzt. Nach der Abkühlung wurde neutralisiert, auf 55 ccm verdünnt und davon 15 ccm zur Bestimmung des Reduktionsvermögens genommen. Es wurde gefunden:

	Invertzucker g	$CaCO_3$ g
I. Versuchsreihe:		
Kontrollversuch (nach 7 Tagen) . .	0,429	0,285
Kultur nach 40 Stunden	0,427	0,284
„ „ 7 Tagen	0,427	0,287
II. Versuchsreihe:		
Kontrollversuch (nach 3 Tagen) . .	0,406	0,286
Kultur nach 40 Stunden	0,402	0,283
„ „ 7 Tagen	0,407	0,287

Maltose. Der Untersuchungsgang wurde wie bei der Saccharose beibehalten. Die übliche Nährlösung enthielt 2% Zucker. Die Analyse des Kontrollversuches und der Kulturen wurde ebenso ausgeführt, wie bei der Saccharose, und ergab:

	Maltose vor der Hydrolyse	Zunahme an Reduktions-vermögen	$CaCO_3$
	g	%	g
Kontrollversuch (nach 10 Tagen)	0,195	65	0,286
Kultur nach 2 Tagen	0,193	—	0,287
„ „ 10 „	0,199	66,8	0,284

Lactose. Gegenüber den vorstehenden Resultaten haben wir bei den Versuchen mit Lactose eine rasche und vollständige Vergärung des Zuckers und dementsprechend Bildung von Säuren beobachtet. Es wurde auch bei dieser Zuckerart, ähnlich wie in der Milch, eine kleine Menge Ameisen-, Essig-, Bernsteinsäure und sehr viel d- und l-Milchsäure konstatiert. Dieses Gemenge der beiden Milchsäuren ist aber streng racemisch, wogegen bei der Milch ein Überschuß von rechtsdrehender Milchsäure festgestellt wurde.

Wir haben eine Lösung von 30 g Lactose in 750 ccm Malzkeimextrakt bereitet, zu welchen wir Pepton und kohlensauren Kalk zugesetzt haben. Derselbe Gang der Untersuchung wie bei den Hexosen wurde auch hier beibehalten, und wir erhielten:

1,20 g flüchtige Säuren (Ameisen- und Essigsäure), auf Essigsäure umgerechnet;

0,39 g krystallisierte Bernsteinsäure und 2 Portionen Zinklactat im Gewichte:

I. Krystallisation	28,94 g
II. „	4,85 g

Die 2%ige wässerige Lösung beider Fraktionen wies keine Ablenkung der Polarisationsebene auf. Ebenso herrscht auch in der Zusammensetzung des Salzes eine vollständige Übereinstimmung mit dem racemischen Lactate:

	I. Krystallisation	II. Krystallisation
	g	g
Wasser (bei 105°)	18,20	18,22
ZnO (durch Calcination)	21,90	21,87

Höchstwahrscheinlich produziert die Mikrobe in der Milch und im künstlichen Nährsubstrat die d- und l-Milchsäure zuerst in genau gleichen Mengen, gleichgültig, welche Art gärfähigen Zuckers vorliegt, nur wird in der Milch aus bis jetzt noch undefinierbaren Ursachen wahrscheinlich ein Teil der l-Milchsäure

zur Bildung der d-Milchsäure benützt, so daß wir in dem Momente, wo dieses Gemisch zur Untersuchung gelangt, einen Überschuß an d-Milchsäure finden.

Bemerkenswert ist der Umstand, daß der Bacillus bulgaricus die Saccharose und Maltose nicht vergären kann,[1]) obwohl er die Lactose sehr leicht angreift; er scheidet ferner auch nicht Invertase und Maltase aus. Diese Eigenschaft ist in so hohem Maße ausgebildet, daß in einem Nährboden, welcher neben Maltose Glucose enthält, wir mit den Mikroben sämtliche Glucose zu zersetzen imstande sind, ohne dabei die Maltose in irgendwelcher Art und Weise zu schädigen, oder auch wir vermögen aus einer Lösung nur die Lactose zu beseitigen, wenn dieselbe daneben noch Maltose enthält.

Wurde die Mikrobe in die Biersüßwürze bei Anwesenheit von kohlensaurem Kalk eingetragen, so entwickelt sich dieselbe gut; schritt man aber dann nach 9 Tagen zu der Analyse der Lösung, so fand man, daß nur ein geringfügiger Anteil des Zuckers verschwunden war. Am Anfange war in der Nährlösung der reduzierende Zucker in einer Menge, die 658 mg ausgeschiedenem Kupfer entsprach, vorhanden; von dieser Menge verschwanden 136 mg, d. h. 68 mg Glucose. Die Menge der gebildeten Säuren betrug, in Milchsäure ausgedrückt, 69 mg.

Es ist daher wahrscheinlich, daß die Mikrobe nur eine kleine Menge der in der Lösung vorhandenen Glucose verbrauchte, denn die Maltose konnte er nicht vergären. Wenn wir nun zu der oben genannten Süßwürze Milchzucker zusetzen, so ist die Entwickelung sehr ausgiebig, wobei die Lactose verschwindet und in Milchsäure übergeführt wird, ein Beweis, daß die Süßwürze keine für die biochemische Wirksamkeit der Mikroben schädliche Substanz enthält.

Einwirkung der Mikroben auf Mannit.

Von den Alkoholen der Zuckerreihe haben wir für unsere Versuche den Mannit gewählt.

In jedes Reagensglas, welches 10 ccm Malzkeimextrakt mit

---

[1]) Durch diese Wahrnehmung wird die Anschauung einiger Bakteriologen korrigiert; diesbezügliche Versuche haben die Autoren nicht mit genügender Gründlichkeit publiziert, so daß man sich nicht die Ursache dieser Divergenz erklären kann.

Pepton und 0,3 g kohlensauren Kalk enthielt, wurden 4°/₀ Mannit eingetragen. Es bildete sich keine Milchsäure, und am Schlusse des Versuches wurde neuerdings genau dasselbe Quantum Zucker wie beim Kontrollversuche gefunden.

Zum Zwecke der Mannitbestimmung wurde die filtrierte Nährlösung bis zur Sirupkonsistenz am Wasserbade abgedampft. Nach Auslaugung derselben mit kochendem Alkohol (4mal mit 10 bis 15 ccm 95°/₀igem Alkohol) wurden die abgekühlten alkoholischen Lösungen vereinigt, filtriert und das Filter mit Alkohol gewaschen; schließlich wurde am Wasserbade abgedampft und der krystallische Rückstand, der fast ausschließlich aus Mannit bestand, gewogen. Es wurde gefunden:

Kontrollversuch . . . . . 0,36 g
Kultur (nach 10 Tagen) . . 0,36 g

Durch Bacillus bulgaricus wird daher der Mannit nicht in Milchsäure übergeführt.

Zusammenfassung.

Der Bacillus bulgaricus läßt sich, außer in der Milch, nicht leicht kultivieren, ohne dabei seine biochemische Eigenschaften zu verlieren. Trotzdem aber gelang es, einen künstlichen Nährboden zu finden, welcher nicht nur für Laboratoriumsversuche, sondern auch für die therapeutischen Applikationen die Milch zu ersetzen vermag.

Wird die Art der in das Nährmedium eingetragenen Zucker variiert, so finden wir, daß

1. von den reduzierenden, nicht hydrolysierbaren Zuckerarten gärfähig sind: Glucose, Galactose, Fructose und Mannose, wohingegen Arabinose, Xylose und Sorbose der Milchsäuregärung nicht unterworfen werden können;

2. von den hydrolysierbaren Zuckerarten vergärt nur die Lactose; Saccharose und Maltose widerstehen der Mikrobe;

3. der Mannit wird nicht in Milchsäure übergeführt.

Die Produkte der Umwandlung sind bei allen Arten der vergärbaren Zucker gleich; nur finden wir hier neben der großen Menge d- und l-Milchsäure einen geringfügigen Anteil der flüchtigen Säuren: Ameisen- sowie Essigsäure, und eine nicht flüchtige Säure: Bernsteinsäure. Die Milchsäuregärung im künstlichen Nährboden entspricht in dieser Richtung der Milchkultur.

Trotzdem aber offenbart sich eine Differenz, und zwar quantitativer Natur, wenn wir die Anteile der Milchsäure bestimmen. Im künstlichen Nährboden bildet sich genau so viel d- und l-Milchsäure, und das Gemenge ist inaktiv, ohne Einfluß auf die Ebene des polarisierten Lichtes; demgegenüber bildet sich in der Milch weniger l-Milchsäure, so daß die d-Milchsäure im Übergewicht ist und das Gemenge dann rechtsdrehend erscheint.

Es ist außer Zweifel, daß am Anfange der Gärung die biochemische Einwirkung der Mikroben auf gärbare Zuckerarten absolut dem Einflusse einiger chemischen Reagenzien, z. B. Alkalien, vergleichbar ist. Die Zucker werden dadurch in ein Gemisch von genau gleichen Teilen der d- und l-Milchsäure übergeführt; dieses Gemenge verändert im künstlichen Nährboden seine Zusammensetzung nicht, wogegen im natürlichen Nährsubstrate ein Teil der l-Milchsäure verschwindet oder aber ein Teil der beiden Säuren auf einmal und dabei die der linksdrehenden rascher als der rechtsdrehenden.

Zweifellos findet die Mikrobe in peptonisiertem Malzkeimextrakt eine Substanz, die sich zur Ernährung besser eignet als die Milchsäure; nach dem Verbrauch der durch die Zuckerspaltung freigemachten Energie benutzt die Mikrobe diese Substanz hauptsächlich zur Bildung der organischen Säuren.

Was die saccharolytischen Enzyme anlangt, so hat sich ergeben, daß Bacillus bulgaricus weder Invertase noch Maltase bildet und daß derselbe weder Saccharose noch Maltose anzugreifen vermag; die Mikrobe produziert nur die Lactase als Endoenzym.

Versuche zur Aufklärung des zellenfreien Gärungsprozesses mit Hilfe des Ultrafilters.

Von

A. v. Lebedew, Moskau.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 1. Juli 1909.)

In meiner vor Jahresfrist erschienenen Mitteilung[1]) habe ich auf Grund kinetischer Messungen darauf aufmerksam gemacht, daß das Verschwinden des Zuckers und die Bildung der Kohlensäure zwei verschiedene Prozesse sind, denn sie verlaufen mit verschiedenen Schnelligkeiten.

Schon damals stellte sich heraus, daß nach 2 bis 3 Stunden, nachdem ungefähr die Hälfte des Zuckers vergoren war, bis 20 % des Gesamtzuckers verschwindet, ohne jedoch die entsprechende Menge CO_2 zu liefern oder aber nach der Hydrolyse wieder aufzutreten. Von der Mitte der Gärung an bis zum Ende gleicht sich diese Differenz allmählich wieder aus und die direkt bestimmte Zuckermenge, welche dann noch in der Lösung bleibt, stimmt ziemlich gut mit der aus der CO_2 berechneten überein.

Von dieser Tatsache ausgehend, stellte ich die Behauptung auf, daß, wenn meine Annahme, die Zuckerabnahme gehe unabhängig von der Kohlensäurebildung vor sich, richtig ist, auch im inaktiven, koenzymfreien Preßsafte der zugegebene Zucker zum Teil verschwinden muß. Ich habe darum Versuche mit dialysiertem Preßsaft[2]) angestellt und dabei wirklich die Be-

---

[1]) Diese Zeitschr. 10, 456, 1908.

[2]) Vgl. Buchner und Antoni, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 136, 1905.

stätigung dieser Annahme feststellen können, aber ich füge hinzu, daß ich mit diesem Verfahren die Gärkraft des Preßsaftes nur abschwächen konnte und dabei in Kauf nehmen mußte, daß der Preßsaft durch die Dialyse stark verdünnt wurde.

Um endlich einwandfreie Resultate zu bekommen, habe ich die Bechholdschen Ultrafilter angewandt, und zwar mit vollem Erfolge, da es mir gelungen ist, einen Rückstand (Filtrans) zu bekommen, welcher nur ca. 5% von der ursprünglichen Gärkraft[1]) (1,5 bis 1,7) besaß, während das Filtrat vollständig inaktiv war.

Ich machte Zucker und Phosphorsäurebestimmungen im Filtrans und im Filtrat mit und ohne Zusatz von Zucker und Phosphaten vor und nach der Hydrolyse; dabei stellte sich heraus, daß im Filtrans, besonders ohne Zusatz von Phosphat, ein Teil des Zuckers (bis 30%) verschwindet, oder richtiger gesagt, das Reduktionsvermögen der Lösung schwächer wird, im Filtrat dagegen die Menge des Zuckers fast unverändert bleibt.

Nun behauptet F. G. Kohl in seiner soeben erschienenen Abhandlung[2]), daß „ein im Glycerinauszuge enthaltenes Enzym imstande ist, den Traubenzucker in Milchsäure zu zerlegen"; dafür macht er die Katalase verantwortlich, die angeblich oxydierende Wirkung besitzt und „die Glykolyse eröffnet, indem sie den Traubenzucker in Milchsäure überführt".[3]) Sogar Oxalsäure soll im Hefeglycerinextrakt auf Zugabe der Glucose erscheinen können. Auf diese Weise will er auch die Funktion des Koenzyms erklären, welches seiner Meinung nach mit der Katalase identisch ist, und führt den regenerierenden Erfolg des Kochsaftes auf die anregende Wirkung des in ihm in anorganischer und organischer (esterartiger) Form enthaltenen Phosphors zurück.

Dem gegenüber stelle ich fest, daß im Filtrat auf Zugabe von Zucker keine Abnahme des Reduktionsvermögens nach mehreren Tagen eintritt, obwohl das Filtrat stürmische Reaktion mit Wasserstoffsuperoxyd gibt. Ebenso ist mir ein direkter

[1]) E. und H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, 1903, S. 80 bis 81.

[2]) Über das Wesen der Alkoholgärung, Leipzig 1909, S. 10.

[3]) Ibid. S. 8.

Nachweis der Milchsäure mißlungen. Ich möchte hinzufügen, daß der vergorene Preßsaft noch eine starke Reaktion mit H_2O_2 gibt und auch dann noch, wenn er nicht mehr mit Hilfe des Kochsaftes regeneriert werden kann. Ich habe seit 2 Jahren eine 50%ige Glycerinlösung des Preßsaftes aufbewahrt, welche stürmische Reaktion mit H_2O_2 gibt, aber mit zugesetztem Kochsaft keineswegs regeneriert werden kann.

Aus allem hier Angeführten geht deutlich hervor, daß Kohl seine Resultate der Mithilfe der Milchsäurebakterien zu verdanken hat. Auch seine Behauptung, daß Kaliumlactat durch die Hefe lebhaft vergoren werden kann,[1]) scheint mir danach sehr zweifelhaft zu sein. Nach meinen Versuchen verschwinden bis 30% und mehr des anwesenden Zuckers, und sollte dabei wirklich Milchsäure gebildet werden, so müßte die Menge derselben mehr als 1% betragen, was sicher gleich zur Gerinnung der Eiweißstoffe führen würde.

Meiner Ansicht nach können nur zwei Fälle eintreten, entweder daß der Zucker sich in seine Bausteine spaltet, worauf das von mir konstatierte Auftreten von Formaldehyd[2]) zurückzuführen ist und wodurch das ganze Reduktionsvermögen vermindert wird, oder aber es entsteht eine Verbindung, welche auch nach der Hydrolyse mit 1,5 n-HCl oder 3 n-H_2SO_4 kein Reduktionsvermögen mehr zeigt. Das erscheint möglich, denn bei der Gärung tritt leicht zerstörbarer Zucker auf, welcher bei der Hydrolyse vernichtet wird.

Ich möchte einige Zahlen aus meinen Untersuchungen hier anführen. Versuch[3]): Von 20 ccm Preßsaft, welcher 1,6 Gärsaft besaß, wurden mit Hilfe von Bechholdschem Ultrafilter[4]) (Druckgas-Stickstoff) durch 2% v [H 2,5% v] Eisessigkollodium-

[1]) l. c. S. 6.

[2]) l. c.

[3]) Ich stelle den Preßsaft seit 2 Jahren nach der Buchnerschen Methode dar, aber von trockener Hefe (mit Zusatz von Wasser), was mehrere Vorteile für sich hat, auf deren Einzelheiten ich hier selbstverständlich nicht eingehen kann. Es sei nur bemerkt, daß es nach diesem Verfahren möglich ist, mehrere Monate hindurch aus den Hefen von derselben Herkunft Preßsaft mit fast unveränderter Gärkraft und voraus berechenbaren Ausbeuten darzustellen.

[4]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 60, 527, 1907. — Diese Zeitschr. 16, 379, 1907.

filter bei 15 Atm. Druck 10 ccm abfiltriert, 10 ccm Wasser zum Rückstand hinzugefügt und weiter 10 ccm abfiltriert. Das nun erhaltene Filtrans verdünnte ich mit Wasser bis auf 20 ccm und teilte es in zwei Teile von je 10 ccm. Zum einen Teil (A) gab ich 2 ccm 50°/₀ige Glucoselösung, von welcher 2 ccm 1,006 g Zucker entsprachen, + 1 ccm Wasser, zum anderen (B) 2 ccm derselben Glucoselösung + 1 ccm Phosphatlösung, welche auf 4 Teile primären 1 Teil sekundären Natriumphosphates enthielt und einen Gehalt von 0,322 g P_2O_5 in 10 ccm aufwies. Zu 10 ccm Filtrat wurden 2 ccm 50°/₀ige Glucoselösung + 1 ccm Wasser hinzugefügt (C). Zu den Kontrollversuchen wurde nicht filtrierter Preßsaft benutzt, welcher bei der Temperatur des Filtrans, d. h. bei Zimmertemperatur gestanden hatte, so lange wie die Filtration dauerte. Zu 10 ccm dieses Preßsaftes gab ich dann 2 ccm obiger Glucoselösung + 1 ccm H_2O hinzu (D). 4 Kölbchen im Waltonschen Apparat[1]) wurden mit je 10 ccm der Flüssigkeiten A, B, C, D beschickt und bei 25° (der Temperatur des Wassers des Thermostaten) stehen gelassen. Darnach wurde die Menge des entwickelten Kohlendioxyds volumetrisch bestimmt. Als Sperrflüssigkeit diente chemisch reines Glycerin, in welchem α für CO_2 bei 25° nur 0,02 beträgt, in Wasser dagegen 0,83[2]); dabei nahm ich der Einfachheit halber an, daß 1 ccm CO_2 4 mg Zucker entspricht, während in Wirklichkeit dessen Menge geringer als 4 ist.

Die folgenden Zahlen geben die Milligramme auf 10 ccm Flüssigkeit an. Die Hydrolyse wurde mit 3 n-H_2SO_4 ausgeführt.

Filtrans mit Zucker und Wasser vor der Gärung:

Zucker vor der Hydrolyse	77,0
„ nach „ „	84,0
P_2O_5 vor der Hydrolyse	56,3
„ nach „ „	63,8

Flüssigkeit A nach 2 Tagen:

Zucker vor der Hydrolyse	577,0
„ nach „ „	622,5
Vergorener Zucker, nach der Menge der entwickelten CO_2 berechnet . . .	47,7

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 47, 185, 1904.

[2]) Jost, Zeitschr. f. physikal. Chem. 37, 342, 1901.

P_2O_5 vor der Hydrolyse 24,4
„ nach „ „ 24,4

Flüssigkeit B (mit Phosphatzusatz):

Zucker vor der Hydrolyse 432,00
„ nach „ „ 460,50
Vergorener Zucker (berechnet) . . . 293,00
P_2O_5 vor der Hydrolyse 67,50
„ nach „ „ 93,75

Flüssigkeit C (Filtrat) zuerst:[1])

Zucker vor der Hydrolyse 792,0
„ nach „ „ 762,0
P_2O_5 vor der Hydrolyse 41,3
„ nach „ „ 56,3

Flüssigkeit C nach 8 Tagen (gab keine Gärung):

Zucker vor der Hydrolyse 802,0
„ nach „ „ 780,0
P_2O_5 vor der Hydrolyse 62,5
„ nach „ „ 62,5

Flüssigkeit D (Kontrollversuch) nach 1 Tage:

Zucker vor der Hydrolyse 111,0
„ nach „ „ 276,0
Vergorener Zucker (berechnet) . . . 620,0
P_2O_5 vor der Hydrolyse 20,0
„ nach „ „ 61,3

Preßsaft (nicht filtriert) ohne Zusatz von Zucker und Phosphat vor der Gärung mit Zusatz von 3 ccm H_2O auf 10 ccm:

Zucker vor der Hydrolyse 29,5
„ nach „ „ 165,0
P_2O_5 vor der Hydrolyse 59,8
„ nach „ „ 75,6

Aus diesen Zahlen kann man ersehen, daß 1. im Filtrans ohne Zusatz von Phosphorsäure 170 mg, mit Zusatz 87 mg und beim Kontrollversuch nur 13 mg Zucker verschwunden sind, ohne eine entsprechende Menge CO_2 zu liefern; 2. das Re-

[1]) Das Filtrat enthält sehr wenig Eiweißstoffe; sie gerinnen bei ca. 75°, die Eiweißstoffe des Filtrans dagegen bei 45°. Diese Tatsache spricht dafür, daß, je höher die Gerinnungstemperatur, um so kleiner das Eiweißmolekül ist.

duktionsvermögen des Filtrates nach 8 Tagen fast unverändert bleibt; 3. nach der Hydrolyse stets Phosphorsäure in größerer Menge nachgewiesen werden kann, als vor der Hydrolyse, und daß 4. im Filtrans die Menge des hydrolysierbaren Zuckers mit der Zeit kleiner, im nicht filtrierten Preßsafte dagegen größer wird. Es sei dabei bemerkt, daß der Preßsaft aus trockener Hefe, welche nur ca. 20% Wasser enthält, kein Glykogen mehr aufweist; trotzdem birgt er jedoch mindestens 2 hydrolysierbare Zuckerverbindungen in sich. Die eine davon geht durch das dichteste Kollodiumfilter (2 × 5% v [H 2,5% v]) hindurch und liefert bei der Hydrolyse Phosphorsäure, die andere dagegen enthält wahrscheinlich keinen Phosphor und ist hochkolloidaler Natur, da schon 1,25% v (H 2,5% v) Filter den größten Teil davon zurückhält. Nach zweimaligem Auswaschen mit Wasser auf dem Kollodiumfilter und Fällen mit Alkohol liefert sie eine schneeweiße, klebrige, gummiartige Masse, welche mit Jod keine Reaktion gibt, in Wasser sehr löslich ist und dabei stark opalesciert. Diese Substanz wird von mir noch näher untersucht werden.

Versuch: 550 ccm Preßsaft wurden mit 1100 ccm Wasser versetzt, aufgekocht, abfiltriert und bis 275 ccm eingedampft. In diesem so erhaltenen Kochsafte[1]) wurden Zucker und P_2O_5 vor und nach der Ultrafiltration bestimmt. Die folgenden Zahlen beziehen sich auf 10 ccm in Milligrammen.

Kochsaft nicht filtriert:

Zucker vor der Hydrolyse	110,0
„ nach „ „	401,0
P_2O_5 vor der Hydrolyse	127,5
„ nach „ „	151,7
„ mit 3 n-KOH[2]) hydrolysiert . . .	153,0

Derselbe Kochsaft durch 1,15% v (H 2,5% v) Filter abfiltriert:

---

[1]) Kochsaft filtriert sich besser als Preßsaft.

[2]) Ich habe noch im vorigen Jahre konstatiert, daß 1. schon nach der Behandlung des Preßsaftes (oder Kochsaftes) mit $^1/_{30}$ n-KOH bei einer Temperatur von 25° (im Thermostaten) fällbare Phosphorsäure nach einem Tage in großen Mengen und 2. nach der Hydrolyse mit Säuren fällbare Phosphorsäure und eine linksdrehende Ketose auftritt.

Zucker vor der Hydrolyse	104,4
„ nach „ „	208,5
P_2O_5 vor der Hydrolyse	130,5
„ nach „ „	166,5

Derselbe Kochsaft durch 2,5%₀ v (H 2,5%₀ v.) Filter abfiltriert:

Zucker vor der Hydrolyse	105
„ nach „ „	173
P_2O_5 vor der Hydrolyse	128
„ nach „ „	170

Derselbe Kochsaft durch zwei 5% v (H 2,5% v) Filter abfiltriert:

Zucker vor der Hydrolyse	109
„ nach „ „	180
P_2O_5 vor der Hydrolyse	129
„ nach „ „	168

Diesen Zahlen nach zu urteilen, ist es höchst wahrscheinlich, daß der Teil, welcher durch das Filter hindurchgeht, ein Zuckerphosphorsäureester ist. Derselbe wird im Filtrat durch Zusatz von 50%igem Alkohol oder Aceton (fällt besser) als Flüssigkeit abgeschieden,[1]) gibt Metallsalze, reduziert Fehlingsche Lösung. Beim Erwärmen auf dem kochenden Wasserbade mit Phenylhydrazin wird die Flüssigkeit nach 5 Minuten gelb, nach 10 bis 15 Minuten erscheint schon reichlich Osazon und nach $1^1/_2$ Stunden füllt sich die ganze Flüssigkeit mit verfilzten gelben Nadeln und wird zum dicken Brei.

Bei der Hydrolyse mit 1,5 n und 3 n Schwefelsäure oder Lauge liefert diese Phosphorsäure. Ein Teil des Zuckers wird dabei zerstört, und es erscheint ein brauner, humusartiger Niederschlag; die Flüssigkeit gibt dann mit Phenylhydrazin kein Osazon mehr, obwohl sie Fehlingsche Lösung reduziert. Es scheint demnach, daß diese esterartige Verbindung nicht einfacher Natur ist.

Um den mit Alkohol oder Aceton isolierten Ester zu reinigen, habe ich ihn mit Bleiacetat ausgefällt (der Niederschlag ist nicht nur im Wasser, sondern auch in Essigsäure ziemlich schwer löslich), das Salz mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das

[1]) Aus dem Kochsafte mit Äther ist er zum Teil extrahierbar.

Schwefelblei abfiltriert, das Filtrat mit Knochenkohle einige Stunden stehen gelassen, noch einmal abfiltriert und im Vakuum unter Durchleiten von Kohlendioxyd eingedampft. Ich erhielt dabei eine fast wasserklare, dicke Flüssigkeit, welche aber nicht destillierbar ist, da sie schon bei 100° verkohlt. Aus dem gereinigten Ester habe ich mit Phenylhydrazin das oben beschriebene Osazon bekommen; da aber alle Versuche, es umzukrystallisieren, bis jetzt scheiterten, habe ich es mit Wasser, Alkohol, Äther ausgewaschen, mit Essigester ausgekocht, abfiltriert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Der Schmelzpunkt lag alsdann unter Zersetzung bei 148 bis 149°. Die so erhaltene Substanz besteht aus schönen, kanariengelben Nädelchen.

Mit Methylphenylhydrazin entstand nach mehrtägigem Stehen bei 35° eine kleine Menge von weißen Krystallen, mit Semicarbazid in saurer Lösung eine sehr kleine Menge von weißen, nicht krystallinischen Flocken.

Ich behalte mir vor, die physikalischen und chemischen Eigenschaften von diesem Phosphorsäureester[1]), ebenso wie von den Estern, welche sich im Preßsafte bei der Zugabe anderer Zuckerarten bilden, zu untersuchen. Ich hoffe nämlich, daß es mir gelingen wird, mit Hilfe von diesen „Zwischenverbindungen" (resp. Kochsaft) die Gärung ohne Enzyme nur mit Hilfe anorganischer Katalysatoren zu reproduzieren. Die Versuche ergaben auch in dieser Richtung ermunternde Resultate.

Die aus dem durch 4% v (H. 2,5% v) Filter filtrierten Kochsafte mit Aceton isolierte Flüssigkeit besitzt außerdem starke regenerierende[2]) Wirkung, die jedoch bei der Hydrolyse verschwindet.

Versuch. 6 Erlenmeyerkölbchen mit Meißlschen Verschlüssen wurden mit 8 g Zucker + 20 ccm Preßsaft (Gärkraft 1,6) + 0,2 ccm Toluol beschickt und im Thermostaten bei 25° 4 Tage stehen gelassen. Nach der oben beschriebenen Methode wurde die aus dem durch Ultrafilter filtrierten Koch-

---

[1]) Um größere Mengen zu bekommen, nahm ich 20 g Glucose + 10 g Phosphat auf 100 ccm Preßsaft, unterbrach die Gärung nach 3 Stunden (siehe oben), kochte aus, preßte die gallertartige Masse ab und filtrierte den Kochsaft durch 4% v [H $2^1/_2$ v] Kollodiumfilter.

[2]) Vgl. E. Buchner und F. Klatte, Über die regenerierende Wirkung des Kochsaftes. Diese Zeitschr. 8, 520, 1908.

saft (4% v [H $2,5\%$ v]) isolierte Flüssigkeit so verdünnt, daß sie in 10 ccm 60 mg P_2O_5 enthielt. 25 ccm wurden mit 25 ccm 3 n-H_2SO_4 3 Stunden im kochenden Wasserbade erhitzt, dann mit $BaCO_3$ neutralisiert und abfiltriert.

2 Kölbchen (A) wurden mit je 20 ccm Phosphatlösung (4 Mol NaH_2PO_4 + 1 Mol Na_2HPO_4), welche 30 mg P_2O_5 in 10 ccm enthielt; 2 Kölbchen (B) mit je 20 ccm nicht gereinigtem Zuckerester, 2 Kölbchen (C) mit demselben, aber in hydrolysiertem Zustande beschickt. Zu allen 6 Kölbchen wurde je 0,4 ccm Toluol hinzugefügt; die Kölbchen wurden gewogen und im Thermostaten 3 Tage bei 25° stehen gelassen und dann wieder gewogen. Die Zahlen sind in Milligrammen von CO_2 angegeben:[1])

A^1 — 0,012	B^1 — 0,243	C^1 — 0,005
A^2 — 0,008	B^2 — 0,236	C^2 — 0,009.

Diese Ergebnisse stimmen auch gut mit Versuchen von F. Resenscheck[2]) überein. Der genannte Autor hat nämlich festgestellt, daß bei Zusatz von kolloidalem Eisenhydroxyd zum Preßsafte (oder Kochsafte) das Koenzym gefällt wird; darum meint er, daß das Koenzym kolloidaler Natur ist. Jetzt findet diese interessante Beobachtung eine andere Erklärung, d. h. das Koenzym resp. der Zuckerester wird durch kolloidales Eisenhydroxyd nicht im adsorbierten, sondern in chemisch gebundenem Zustande gefällt. Diese Erklärung scheint mir desto eher annehmbar zu sein, als der von mir isolierte Zuckerester mit Eisensalzen eine in Wasser ziemlich schwer lösliche Verbindung gibt und F. Resenscheck aus dem mit Eisenhydroxyd gefällten Niederschlage das Koenzym durch Auswaschen mit Wasser nicht zurückzugewinnen vermochte.[3])

Jedenfalls wird es, wenn diese Verbindung[4]) in reinem Zustande von mir dargestellt ist, nicht schwer zu entscheiden sein, ob sie schon das eigentliche Koenzym ist, wie es von Harden

[1]) Ähnliche Resultate gab auch die mit Aceton isolierte Flüssigkeit, welche durch Fällung mit Bleiacetat gereinigt wurde (siehe oben).

[2]) Diese Zeitschr. 15, 1, 1908.

[3]) l. c. S. 8 bis 9.

[4]) Nach Angaben von L. Iwanoff (Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 281, 1907) hat derselbe nach einer anderen Methode (durch direkte Fällung der fast vergorenen Flüssigkeit mit Kupferacetat) einen Zuckerester isoliert. Da aber der Schmelzpunkt des von ihm erhaltenen Osazons

und Jung[1]) bereits vermutet wurde; es ist auch sehr wahrscheinlich, daß dieser Ester eine Zwischenverbindung der Spaltung der Dextrose in Alkohol und Kohlendioxyd ist, da aus meinen zahlreichen Versuchen hervorgeht, daß im nicht filtrierten Preßsafte diese Verbindung in der Mitte der Gärung in den größten Mengen auftritt, besonders bei Zusatz von Phosphat.

Die ausführlichen Berichte über meine sehr langwierigen Untersuchungen sollen später erfolgen.

Über die von mir dargestellte esterartige Verbindung kann ich noch folgendes mitteilen:

Mit p-Nitrophenylhydrazin bildet sich ein tiefrotes Osazon, welches in Berührung mit Alkali augenblicklich tiefblau wird. Das Osazon schmilzt, auf dem Tonteller getrocknet, bei 188 bis 190° und löst sich in Alkohol und Aceton (in letzterem besser), besonders leicht in Pyridin, woraus es mit Äther fällbar ist, allerdings nicht in krystallinischem Zustande. Schmelzpunkt unter Zersetzung 190 bis 192°.

Mit p-Bromphenylhydrazin in verdünntem Alkohol bilden sich nach eintägigem Stehen bei 35° im geschlossenen Kölbchen große kugelige Aggregate von gelben feinen Nadeln. Das Osazon

---

bedeutend von dem von mir bestimmten abweicht (142° anstatt 148 bis 149°), erscheint es sehr fraglich, ob er dieselbe Substanz in Händen hatte. Jedenfalls kann nach oben Gesagtem kaum ein Zweifel bestehen, daß der bei der Vergärung der Dextrose erscheinende Ester keine Triose oder Methylglyoxal enthält. Als ich anstatt Glucose Fructose nahm, habe ich ein ebenso nicht umkrystallisierbares, aus gelben Nadeln bestehendes Osazon bekommen, welches mit Wasser, Alkohol, Äther ausgewaschen, mit Essigäther ausgekocht und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet den Schmelzpunkt unter Zersetzung 148 bis 149° besaß. Es ist höchst wahrscheinlich, daß es dasselbe Osazon ist. Nach dem Verfasser soll es aus blaßgelben Blättern vom Schmelzpunkt 125° bestehen (l. c. S. 287).

W. J. Joung (Proceed. of the chem. Soc. 23, 65, 1907) hat nach der Entfernung des freien Phosphates aus der Gärflüssigkeit mit Magnesiumnitrat und nachfolgendem Zusatz von Bleinitrat einen Niederschlag bekommen, welcher nach der Behandlung mit Schwefelwasserstoff eine saure Flüssigkeit gab, die nach ihren Eigenschaften zu urteilen sehr an die von mir dargestellte erinnert. Die Analyse des Bleisalzes ergab die empirische Formel $C_3H_5O_6PPb$. Leider hat der Verfasser nicht erwähnt, ob das Bleisalz in krystallisiertem Zustande analysiert wurde.

[1]) Proc. of the Roy. Soc. 80, 303, 1908.

ist leicht löslich in Aceton, aus welchem es durch Wasser krystallinisch fällbar ist.

Das Phenylosazon löst sich leicht in einer schwachen, wässerigen Alkalilösung, aus welcher es durch Alkohol als eine gelbe, flockige, nicht krystallinische Masse gefällt wird. Die wässerige Lösung des Osazons ist mit Bleiacetat fällbar (amorph). Die alkalische Lösung mit Essigsäure im Überschusse versetzt, gibt mit Mercuronitrat einen gelben krystallinischen Niederschlag, welcher aus mikroskopisch kleinen Nädelchen besteht; derselbe ist aber nicht beständig, sondern schwärzt sich infolge der Reduktion des Salzes zu metallischem Quecksilber.

Diese Fähigkeit des Osazons, Salze zu bilden, hat mich zuerst zu der Vermutung veranlaßt, daß es das Osazon einer Kohlenhydratsäure sei, aber bei der Verbrennung bleibt im Schiffchen ein Rückstand, welcher sich als Phosphorsäure erwies; außerdem sublimiert ein Teil der Phosphorsäure an den Wänden des Verbrennungsrohres. Ich habe darum die quantitative Bestimmung der Phosphorsäure durch Zusammenschmelzen des Osazons mit Sodasalpetergemisch ausgeführt. Es liegt damit ein bis jetzt noch nicht bekannter Fall vor, daß ein phosphorhaltiges Osazon in krystallisiertem Zustande isoliert worden ist.[1])

Die vorläufig ausgeführten Analysen stimmen am besten mit der Formel $C_{24}H_{29}N_6O_6P$ überein, d. h. mit der Phenylhydrazidophosphorsäureverbindung eines Hexosazons.[2])

---

[1]) C. Neuberg und B. Brahm (diese Zeitschr. 5, 449, 1907) haben aus der Inosinsäure eine amorphe, gelblich-weiße Masse erhalten, welche organisch gebundenen Phosphor enthielt und welche sie als die Phenylhydrazinverbindung einer Pentosephosphorsäure ansprechen.

[2]) In einer soeben erschienenen Arbeit (Centralbl. f. Bakt. II. Abt., 24, 1, 1909) gibt Leonid Iwanoff an, daß das Osazon des Produktes aus Glucose nach mehrfachem Umkrystallisieren ebenfalls gelblich-weiße Blättchen vom Schmelzpunkt 127° gab (l. c. S. 4). Der Verfasser glaubt, daß es das Osazon einer Triose (l. c.) oder aber eines „einer Triose am nächsten stehenden Stoffes" ist (l. c. S. 12). Da aber nur zwei Triosen theoretisch möglich und bekannt sind, mußte es entweder Glycerinaldehyd oder Dioxyaceton sein; jedoch haben „alle vom Verfasser angestellten Versuche, um mit Hilfe von Zymin oder Hefanol die Phosphorsäure an eine künstlich dargestellte Triose zu binden, zu negativen Resultaten geführt" (l. c.). Die einzige Analyse, welche der Verfasser gemacht hat, um die Natur des Osazons festzustellen — Bestimmung des Stickstoffs nach

$$\begin{array}{l} C_6H_5NHNH - \\ O = P - O - C_4H_5(OH)_2 - C \text{———————} CH \\ HO - \qquad\qquad\qquad\qquad\quad \| \qquad\qquad\quad \| \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad N.NHC_6H_5 \quad N.NHC_6H_5 \end{array}$$

Berechnet:	Gefunden:
C = 54,55 %	C = 53,22 %
H = 5,49 %	H = 5,76 %
N = 15,91 %	N = 16,19 %
P = 5,87 %	P = 5,92 % (nach Carius)

Selbstverständlich betrachte ich diese Formel noch nicht als endgültig festgestellt, da die Substanz ungeheuer schwer zu verbrennen ist. Ich werde versuchen, den Kohlenstoff auf nassem Wege zu bestimmen.

Als ich den Zuckerester zwei Tage im Thermostaten bei 25° mit 0,1 n-Kalilauge hydrolysierte, konnte ich nach 1½-stündiger Erwärmung auf dem Wasserbade nur kleine Mengen des Osazons vom Schmelzpunkt 148° erhalten, jedoch kein Glucosazon, die Flüssigkeit aber gab nach der Hydrolyse in reichlicher Menge einen gelben Niederschlag auf Zusatz von Jod und Kalilauge. Wenn bei der Hydrolyse wirklich sich Äthylalkohol bildet, dann wäre die Aufgabe gelöst, die Gärung ohne Zymase zu reproduzieren. Diese Beobachtung werde ich weiter verfolgen.

Dumas —, ist nicht genügend, und die von ihm erhaltene Zahl (20,88 % N), welche mit dem Prozentgehalt des Triosephenylosazons (20,9° N) gut übereinstimmt, ist nicht beweisend. Nach E. Fischer und Tafel (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 20, 1089, 1887) ist das Phenylglycerosazon rein gelb und besteht aus langgestreckten Blättchen vom Schmelzpunkt 131 bis 132°, nach L. Iwanoff dagegen soll es aus „fast weißen. nur leicht gelblichen Blättchen vom Schmelzpunkt 127 bis 128°" bestehen. Es ist höchst wahrscheinlich, daß das vom Verfasser angeblich dargestellte Osazon weiter nichts als Acetylphenylhydrazin ist, welches Blättchen vom Schmelzpunkt 128° bildet. Auf andere von dem Autor erhaltene Ergebnisse werde ich noch zurückkommen.

Über die Bildung von Buttersäure aus Alkohol unter dem Einfluß der stillen Entladung.

Von

Walther Löb.

(Aus der chemischen Abteilung des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 6. Juli 1909.)

Mit 1 Figur im Text.

Bei Versuchen über das Verhalten des Stickstoffs in Gegenwart einfacher organischer Verbindungen unter dem Einfluß der stillen Entladung beobachtete ich häufig das Auftreten des charakteristischen Geruchs der Buttersäure, so z. B. bei der Einwirkung der Entladung auf feuchtes Methan, wie ich bereits mitgeteilt habe,[1]) auf feuchtes Acetylen mit und ohne Stickstoff, auf wässerigen Alkohol und andere Substanzen. Es muß demnach dem Auftreten der Fettsäure oder vielleicht mehrerer eine recht allgemeine Reaktion zugrunde liegen, deren Aufklärung bei der Bearbeitung des eingangs erwähnten Problems notwendig wurde. Der Erledigung dieser Aufgabe standen größere experimentelle Schwierigkeiten im Wege, vornehmlich durch die schlechten Ausbeuten, welche die Versuche besonders noch bei der Notwendigkeit der Trennung von anderen flüchtigen Verbindungen lieferten. Das bei den Methanversuchen[1]) analysierte Bariumsalz, dessen Bariumgehalt auf ein Gemisch von Capron- und Heptylsäure hinzuweisen schien, war zweifellos noch unrein und enthielt nach späteren Versuchen als einzige höhere Säure die Buttersäure. Nach langwierigen Bemühungen gelang es, durch Wahl der Anordnung und der Ausgangsmaterialien relativ brauchbare Ausbeuten zu erzielen,

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **41**, 87, 1908.

welche die Reinigung der Säure und ihre Analyse gestatteten. Es zeigte sich dabei, daß in allen untersuchten Fällen die Buttersäure als einzige faßbare höhere Fettsäure entsteht und Trägerin des beobachteten Geruches ist.

Der Reaktionsgang konnte nur indirekt aufgeklärt bzw. auf eine Anzahl von Möglichkeiten zurückgeführt werden, die in den Versuchen zweifellos realisiert sind.

Unter bestimmten Bedingungen entsteht die Buttersäure bzw. ihr Ester aus Äthylalkohol. Nun zerfällt der Alkohol, wie ich bereits früher nachgewiesen und durch neuere Versuche bestätigt habe, primär in Wasserstoff und Acetaldehyd, so daß es naheliegt, diesen als Urheber der Buttersäurebildung anzusprechen.

Die bereits von Buchner und Meisenheimer[1]) zur Erklärung der Buttersäuregärung herangezogene Umwandlung des Acetaldehyds über Aldol in Buttersäure erklärt ihre Bildung:

$$2\,CH_3CHO \longrightarrow CH_3CHOHCH_2CHO \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH.$$

Mit Hilfe dieser Annahme wird es ohne weiteres verständlich, daß alle Substanzen, die bei der Einwirkung der stillen Entladung Acetaldehyd liefern, mehr oder weniger Buttersäure bilden können. Die Anzahl solcher Verbindungen ist nun eine sehr große, da der Acetaldehyd selbst aus Methan und Kohlenoxyd entsteht und in diese beiden Körper zerfällt. Sobald also die Bedingung zur, wenn auch nur vorübergehenden, Existenz von CO und CH_4 gegeben ist, so besteht die Möglichkeit der Buttersäuresynthese.

So liefert feuchtes Methan nach der Gleichung:

$$CH_4 + H_2O \rightleftarrows CO + 3\,H_2$$

Kohlenoxyd, das mit dem Ausgangsmaterial die für die Buttersäure notwendige Kombination schafft. Freilich läßt sich der Acetaldehyd als solcher bei Anwendung von feuchtem Methan nicht isolieren. Das mag an der schlechten Ausbeute liegen; aber seine tatsächliche Bildung in der Form eines faßbaren Zwischenproduktes erscheint auch für die Entstehung der Buttersäure unnötig, da die Synthese aus Kohlenoxyd und Methan in einem kontinuierlichen Prozeß bis zur Buttersäure

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1410, 1908. Vgl. auch Magnus-Levy und K. Spiro; Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 42. 149 1902.

verlaufen kann. Dieses Verhalten scheint damit zusammenzuhängen, daß die Entladung fast ausschließlich auf Dämpfe und Gase einwirkt und dadurch den Acetaldehyd, der aus Methan und Kohlenoxyd nur in geringen Mengen entsteht — das Gleichgewicht der Reaktion liegt stark auf der Seite der Acetaldehydzersetzung —, an seiner flüssigen Abscheidung überhaupt verhindert.

Man kann also anstatt des Acetaldehyds selbst auch solche Substanzen, welche den Acetaldehyd zu bilden vermögen, als Ausgangsmaterialien der Buttersäuresynthese bezeichnen. Es ist nicht zu entscheiden, ob bei der Zersetzung des Alkohols der primär entstandene Aldehyd oder nach dessen Zerlegung in Methan und Kohlenoxyd diese Substanzen in einer Reaktion zu Buttersäure zusammentreten.

Jedenfalls ist die Tatsache, daß in allen Systemen, in denen bei der Entladung die Möglichlichkeit der Acetaldehydbildung besteht, auch Buttersäure auftritt, ein sicherer Beweis für den genetischen Zusammenhang der beiden Reaktionen. Die in einer früheren Arbeit [1]) erwogene Annahme, daß durch die Äthylenbildung aus Methan, die in beträchtlichem Maße eintritt, eine Reaktion mit Ameisensäure nach der Formel:

$$HCOOH + (CH_2 : CH_2)_x = CH_3(CH_2)_{2x-1} COOH$$

zu höheren Fettsäuren führt, halte ich deshalb für unwahrscheinlich.

Wenn Kohlenoxyd und Methan als Ausgangsstoffe der Buttersäure fungieren, so ist die Synthese derselben, wie die der Kohlenhydrate, aus Kohlensäure und Wasser durchführbar. Es liegt nur an den experimentellen Schwierigkeiten, der Apparatur und den ungeheuer schlechten Ausbeuten, in denen diese Nebenreaktionen auftreten, daß die Darstellung aller möglichen Substanzen nicht in einem Prozeß gelingt. Wohl aber läßt sich die direkte Synthese durchführen, wenn man die aus feuchter Kohlensäure entstehenden, geeigneten Stoffe als Ausgangsprodukte neuer Versuche in reichlicherer Menge wählt, als sie im Versuch entstehen. Die Bildung der Buttersäure aus Kohlensäure und Wasser wird durch folgende Formelreihe wiedergegeben:

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 87, 1908.

$$\begin{array}{ll} \text{I.} & CO_2 + H_2O \rightarrow CO + H_2O + O \\ \text{II.} & CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2 \\ \text{III.} & CO + 3\,H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O \\ \text{IV.} & 2\,CH_4 + 2\,CO \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH. \end{array}$$

Jede dieser einzelnen Reaktionen für sich ist experimentell ausgeführt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche der Buttersäurebildung aus Alkohol zeigen, daß, wenn nicht der primär gebildete Acetaldehyd, so dessen Zersetzungsprodukte, Kohlenoxyd und Methan, die Buttersäurebildung bedingen. Wählt man feuchtes Methan allein als Ausgangsmaterial, so besteht noch eine andere Möglichkeit. Methan und Wasser liefern, wie erwähnt, zum Teil Kohlenoxyd und Wasserstoff. Diese beiden notwendigen Komponenten sind daher vorhanden. Jedoch tritt die Kohlenoxydbildung in den Hintergrund gegenüber der Wasserstoffabspaltung aus Methan und seiner Kondensation, die zweifellos bis zum Acetylen geht. Denn Methan und Acetylen geben unter dem Einfluß der Entladung die gleichen festen Kondensationsprodukte.[1]) Aus Acetylen vermag sich Acetaldehyd durch Wasseraufnahme zu bilden:

$$\begin{matrix} CH \\ ||| \\ CH \end{matrix} + \begin{matrix} H_2 \\ \\ O \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CHO \end{matrix}$$

so daß auch diese Kombination bei den Methanversuchen als Vorbedingung der Buttersäuresynthese in Frage kommt. In der Tat besitzt nach der Einwirkung der Entladung auf feuchtes Acetylen, wie eingangs bemerkt, die Reaktionsflüssigkeit den unverkennbaren Geruch nach Buttersäure. Diese Synthese aus Acetylen kann also immer eintreten, wenn Methan vorhanden ist, d. h. auch bei der Zersetzung des Alkohols. Es ist ungemein schwierig oder sogar ausgeschlossen, zwischen diesen Möglichkeiten zu entscheiden, weil, wie aus dem für CO_2 und H_2O angeführten Formeln schon ersichtlich, bereits ein Stoff eine ganze Reihe aus ihm entstehender bedingt. So ließ sich die Frage, ob Acetylen und Wasser oder Kohlenoxyd und Methan die Ausgangsstoffe der betrachteten Reaktion aus Alkohol sind, nicht dadurch entscheiden, daß man einmal

[1]) Vgl. auch Losanitsch, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 40, 4659, 1907.

Methan ohne Kohlenoxyd (wobei Acetylen entsteht), dann mit Kohlenoxyd untersuchte. Denn feuchtes Methan liefert durch Umsetzung mit Wasser sofort Kohlenoxyd, so daß dieser Bestandteil auch ohne Kohlenoxydzusatz zugegen ist.

Nachdem die Buttersäurebildung aus den anfangs erwähnten Substanzen qualitativ nachgewiesen war, kam es mir darauf an, geeignetes Ausgangsmaterial und geeignete Versuchsbedingungen zu ermitteln, um die zur Analyse und Sicherstellung des qualitativen Befundes notwendigen Ausbeuten zu erzielen. Am besten bewährte sich schließlich Äthylalkohol. Daß Acetaldehyd selbst sich weniger eignet, liegt an Nebenreaktionen, auf die ich später zurückzukommen gedenke, und an dem Umstande, daß die Reaktion anscheinend am besten bei höherer Temperatur, der Siedetemperatur des Alkohols, verläuft, die sich natürlich in offenen Gefäßen in Gegenwart von Acetaldehyd nicht herstellen läßt. Wie bei allen Entladungsversuchen, so ist auch hier die Form des Elektrisators von Einfluß, und es ist wohl möglich, daß die Ausbeuten durch geeignete Modifikationen gesteigert werden können. Dieselben sind, wie aus den experimentellen Daten hervorgeht, sehr schlecht. Durchleitung von Kohlensäure steigert sie nicht; die Acetaldehydbildung wird durch die Spaltung der Kohlensäure und die Oxydation des Alkohols anscheinend nur unwesentlich gesteigert; vorwiegend tritt der glatte Zerfall des Alkohols in Aldehyd und Wasserstoff als primäre Reaktion ein. Übrigens entsteht bei Anwendung von Alkohol nicht direkt freie Buttersäure, sondern ihr Äthylester, so daß der Salzdarstellung die Verseifung vorausgehen muß.

Vom theoretischen und biologischen Standpunkt aus sind die Beziehungen dieser Entladungsreaktionen zu verschiedenen Gärungsvorgängen besonders interessant. Freilich handelt es sich hier nicht um den von selbst verlaufenden Zerfall eines größeren Molekularaggregates unter dem Einfluß eines Katalysators in die Gärungsprodukte, sondern umgekehrt um Synthesen unter Energiezufuhr. Aber es ist möglich, worauf ich schon mehrfach[1]) hingewiesen habe, daß solche Synthesen, denen ein Zerfall vorausgeht, einen Teil der Gärungsvorgänge

[1]) Vgl. z B. Zeitschr. f. Elektrochem. 13, 511, 1907.

bilden. Speziell für die Buttersäure- und Citronensäuregärung vertreten neuerdings Buchner und Meisenheimer[1]) und Buchner und Wüstenfeld[2]) die Auffassung, daß synthetische Prozesse aus den Abbausubstanzen der Kohlenhydrate bzw. des Glycerins die Bildung der Endprodukte veranlassen.

Ohne auf die Frage der Gärungshypothesen hier einzugehen, seien nur die Beziehungen dargestellt, welche die Entladungsreaktionen mit der biologischen Grundreaktion, der Spaltung der feuchten Kohlensäure, verbinden.

Die Spaltung:

$$2\,CO_2 = 2\,CO + O_2$$
$$2\,CO + H_2O = (CO + H_2) + CO_2$$

führt zu der Grundkombination $(CO + H_2)$ des Zuckeraufbaus. Die Gärungsprodukte nicht oxydativen Ursprungs bilden sich aus dem fertigen Zucker anaerob. Es zeigt sich nun, daß aus diesen eine Synthese des Zuckers bedingenden Stoffen, Kohlenoxyd und Wasserstoff — unverbunden oder verbunden — die anaeroben Gärungsprodukte mit Leichtigkeit synthetisch entstehen. Daß diese Tatsachen bei der Auffassung der natürlichen Gärungen berücksichtigt werden müssen, habe ich eben erwähnt. In welcher Weise die fraglichen Verbindungen aus feuchter Kohlensäure entstehen, zeigen die folgenden Formeln, die sich an die oben für die Kohlensäurezersetzung gegebenen anschließen:

1. $xCO + xH_2 = C_xH_{2x}O_x$ Zucker[3])
2. $CO + H_2O = HCOOH$ Ameisensäure[3])
3. $CO + 3\,H_2 = CH_4 + H_2O$ Methan[3])
4. $CO + CH_4 = CH_3CHO$ Acetaldehyd[4])
5. $CH_3CHO + H_2 = CH_3CH_2OH$ Alkohol[5])
6. $2\,CH_3CHO = CH_3CH_2CH_2COOH$ Buttersäure.

Nur einen Teil der aus feuchter Kohlensäure entstehenden Produkte, deren Darstellung bis jetzt experimentell durchgeführt ist, habe ich hier angeführt. Die Kondensation des Methans,

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1410, 1908.

[2]) Diese Zeitschr. 17, 395, 1909.

[3]) Löb, Zeitschr. f. Elektrochem. 12, 282, 1906.

[4]) Losanitsch und Jovitschitsch, Ber. d. Deutsch chem. Ges. 30, 135, 1897.

[5]) Ezio Comanducci, Chem. Centralbl. 1, 1530, 1909.

die in erster Reihe zu Kohlenwasserstoffen mit zwei Kohlenstoffatomen, Acetylen und Äthylen, führt, und die Reaktion zwischen Methan und Kohlensäure zu Essigsäure gehören auch in das Schema. Bezüglich dieser und anderer Reaktionen verweise ich auf meine früheren Mitteilungen. Jedenfalls ist es sicher, daß, wenn das Eingreifen des Stickstoffes in die einfachen organischen Verbindungen aufgeklärt ist, ein Problem, zu dem Berthelot bereits Material geliefert hat,[1]) die natürliche organische Chemie sich aus der einfachsten biologischen Reaktion, der Zersetzung der feuchten Kohlensäure, welche auch in der Natur die Quelle aller organischen Verbindungen ist, systematisch wird ableiten lassen.

Alle die oben angegebenen Reaktionen sind umkehrbar. Zwar ließ sich bei der Schwierigkeit, konstante elektrische Bedingungen lange Zeit zu erhalten, quantitativ das Gleichgewicht nicht feststellen. Der qualitative Nachweis der Umkehrbarkeit gelingt aber leicht, wenn man die Reaktionsprodukte einer Reaktion als Ausgangsmaterialien eines neuen Versuches wählt. So liefert Formaldehyd Kohlenoxyd und Wasserstoff, Methan und Wasser die gleichen Produkte usw.

Bevor ich auf die Darstellung der Buttersäure aus Alkohol eingehe, mögen die Versuchsbedingungen, die einige Neuerungen enthalten, kurz beschrieben werden.

Versuchsanordnung.

Als primäre Stromquelle diente die Lichtleitung mit 110 Volt Spannung, die einerseits zu dem Motor eines Rotax-Unterbrechers (geliefert von der Eelektrizitätsgesellschaft Sanitas in Berlin), andererseits zu der Primärspule eines Induktoriums mit 25 cm Funkenlänge führt. Beide Leitungen enthalten Regulierwiderstände.

In dem Rotax-Unterbrecher wird durch den Motor Quecksilber zentrifugal in eine Rinne geschleudert, durch die eine exzentrisch rotierende Lederscheibe mit einzelnen Kontaktstellen streift. Durch Verschiebung der Exzentrizität läßt sich die Unterbrechungszahl variieren, ebenso durch die Umdrehungsgeschwindigkeit des Motors mittels des Regulierwiderstandes. Da man schließlich die Stromstärke in der Primärspule beliebig einstellen, sowie die Stellung der Kontaktscheibe im Unterbrecher an einer mit Teilung versehenen äußeren Scheibe ablesen kann, so ist man imstande, ganz genau präzisierte Bedingungen zu schaffen und

---

[1]) Vgl. z. B. Compt. rend. 126, 616 ff., 1898.

jederzeit zu reproduzieren. So lassen sich auch die schwer kontrollierbaren Verhältnisse in der Sekundärspirale des Induktoriums festlegen, so weit sie nicht durch die stets zu berücksichtigende Form des Elektrisators, seinen Wandabstand, die Temperatur der Dämpfe modifiziert werden.

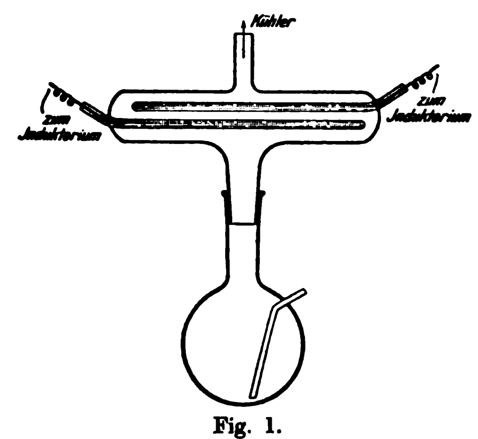


Fig. 1.

Die Entladungseinrichtung zeigt die nebenstehende Fig. 1. Ein Rundkolben von 250 ccm Fassungsraum trägt den Horizontalelektrisator. Der Entladungsraum, eine 25 mm weite Glasröhre, umgibt die als Elektroden dienenden Elektrolyte (Kochsalzlösungen), die sich in horizontalen, 5 mm weiten, einseitig verschlossenen Glasröhren befinden, die 5 mm voneinander entfernt sind. An den Elektrisator schließt sich ein Rückflußkühler, der zum Auffangen der Zersetzungsgase an die geeigneten Gefäße angeschlossen wird. Falls durch die Flüssigkeit Gase geleitet werden, trägt der Rundkolben ein seitlich eingeschmolzenes, fast bis zum Boden reichendes Glasrohr.[1])

Versuche.

Von den oft wiederholten, mit vielen Variationen durchgeführten Versuchen gebe ich nur wenige wieder. Das Auftreten von Buttersäure wurde stets beobachtet; die Ausbeuten schwankten jedoch und waren bei den unten angegebenen Bedingungen die besten. Stets sind langdauernde Versuche erforderlich, um die Säure in einer zur Analyse ausreichenden Menge zu erhalten. Das Gewicht des analysierten Salzes gibt gleichzeitig die Ausbeute nach dem Reinigungsprozesse aus dem bezüglichen Versuch an; der qualitativen Feststellung der Säure hatten andere, hier nicht wiedergegebene Versuche gedient.

Der Alkohol im Rundkolben wird zunächst zum Sieden erhitzt, bis der Elektrisator ganz von seinem Dampfe erfüllt ist. Dann wird der Strom eingeschaltet und so geregelt, daß im Dunkeln ein schwaches bläuliches Leuchten ohne Funkenentladung sichtbar ist. Da der Kühler oben offen bleibt, so findet die Entladung unter Atmosphärendruck statt. Ich beschränke mich hier auf die lediglich zur Gewinnung der Buttersäure angestellten Versuche, ohne die bereits früher[2]) durchgeführten Analysen

[1]) Die ganze Einrichtung für Entladungsreaktionen ist mit den mir gewährten Mitteln der Jubiläumsstiftung für Deutsche Industrie beschafft worden, wie ich auch an dieser Stelle dankbar erwähne.

[2]) Vgl. Zeitschr. f. Elektrochem. 12, 282, 1906.

der Zersetzungsgase und der neben Buttersäure entstehenden Produkte genauer zu beschreiben.

Versuch 1.

50 ccm 75%igen Alkohols wurden in den Rundkolben gebracht und durch das seitliche Ansatzrohr dauernd Kohlensäure geleitet. Wie sich später herausstellte, ist die Kohlensäurezufuhr ohne Einfluß auf die Buttersäurebildung. Nachdem der Alkohol zum Sieden gebracht war, wurde die Entladung in Gang gesetzt und 23 Stunden durchgeführt. Die Stromstärke in der Primärspule des Induktoriums betrug durchschnittlich 1,1 Amp. Die Exzentrizität der Rotaxscheibe war bei der an diesen Apparaten angebrachten Skala auf 5 eingestellt. Die Umdrehungsgeschwindigkeit des Motors wurde durch Einschaltung etwa des halben mit dem Apparat gelieferten Regulierwiderstandes (Gesamtwiderstand 75 Ohm, eingeschaltet 47 Ohm) gemindert. Diese Bedingungen sind durch Ausprobieren als die brauchbarsten für den Horizontalelektrisator gefunden worden.

Nach Beendigung des Versuchs wird der stark nach Acetaldehyd riechende Kolbeninhalt mit 150 ccm Wasser verdünnt und die Flüssigkeit im Ätherextraktionsapparat 12 Stunden ausgeäthert. Die wässerige Lösung, die viel Formaldehyd enthält, ist frei von Buttersäure bzw. ihrem Ester. Die filtrierte ätherisch-alkoholische Schicht wird nun bei 30 bis 40° im Vakuum langsam destilliert. Dabei geht außer den Lösungsmitteln Acetaldehyd, Formaldehyd, Ameisensäure bzw. Ameisensäureester über. Zurück bleibt wenig dickliche Flüssigkeit von esterartigem Geruch, gemischt mit dem der Buttersäure. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die Flüssigkeit zuerst mit 2%igem Barythydrat durch mehrstündiges Kochen zu verseifen. Nach der Fällung des Bariums mit Schwefelsäure und Filtration werden die flüchtigen Säuren, Buttersäure und Ameisensäure, mit Wasserdampf abgetrieben. Essigsäure scheint nicht entstanden zu sein. Jedenfalls beteiligt sich die Kohlensäure, wie bereits erwähnt, bei der leichten Zersetzlichkeit des Alkohols nur ganz unwesentlich an der Reaktion. Bei Ausschluß von Kohlensäure entsteht Essigsäure überhaupt nicht. Aber auch hier war die vermutete Oxydation des Aldehyds durch die Kohlensäure nicht in nachweisbarem Umfange aufgetreten. Das Destillat, das stark nach Buttersäure riecht, wird zur Zerstörung der Ameisensäure 4 Stunden mit Chromsäure-Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht, abermals destilliert und weiter Wasserdampf bis zur neutralen Reaktion der übergehenden Flüssigkeit durchgeleitet. Aus dem Destillat ließ sich das Bariumsalz der Buttersäure in rein weißer Form gewinnen. Die auf ein kleines Volum gebrachte Lösung des Bariumsalzes wurde in einen gewogenen Platintiegel filtriert, auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht und im Vakuumexsiccator bis zur Konstanz des Gewichtes gelassen. Vor der Analyse wurde das Salz noch 1 Stunde im Toluolbad getrocknet, ohne das Gewicht zu verändern.

Angewandte Substanz: 0,0885 g Bariumsalz.
$BaSO_4$ gef.: 0,0654 g = 43,51% Ba.
Berechnet für $(C_4H_7O_2)Ba$: 44,13%.

Versuch 2.

50 ccm 75%igen Alkohols wurden in gleicher Weise, wie im Versuch 1, aber ohne Durchleitung von Kohlensäure der Entladung während 15 Stunden unterworfen. Die Gasentwicklung betrug pro Stunde etwa 170 ccm. Die durchschnittliche Zusammensetzung des Gases war:

CO_2: 1,4%; CO: 40%, H_2: 56%, Kohlenwasserstoffe: 2,6%.

Die Abspaltung von Wasserstoff und die Acetaldehydbildung ist wieder der vorherrschende Prozeß. Das durch Zerfall des Acetaldehyds in CO und CH_4 entstehende Methan unterliegt, wie früher mitgeteilt, weiteren Reaktionen, hauptsächlich der Umsetzung:

$$CH_4 + H_2O = CO + 3H_2,$$

an die sich die beschriebenen synthetischen Vorgänge anschließen.

Nach dem Zusatz von Wasser, dem Abdestillieren der flüchtigsten Bestandteile aus dem Wasserbade und dem Ausäthern des wässerigen Rückstandes wurde, wie im vorigen Versuch, die nach Entfernung des Äthers zurückbleibende Flüssigkeit mit Barythydrat verseift, und nach Entfernung des Bariums mittels Schwefelsäure die flüchtigen Säuren durch direkte Destillation und Dampfdestillation abgetrieben. Das von Essigsäure freie, aber noch Ameisensäure enthaltende Destillat roch stark nach Buttersäure. Durch mehrtägiges Kochen mit frisch gefälltem Silbercarbonat bis zum Aufhören der Reduktionswirkung liefert das Filtrat beim Eindunsten im Vakuum über Schwefelsäure weiße Nädelchen von buttersaurem Silber.

Angewandte Substanz: 0,0654 g Silbersalz.
Ag gef.: 0,0334 = 51,1% Ag.
Berechnet für $(C_4H_7O_2)Ag$: 55,35% Ag.

Bei einem dritten, in gleicher Weise 28 Stunden lang durchgeführten Versuch ergab die Analyse des resultierenden Bariumsalzes:

Angewandte Substanz: 0,0694 g.
$BaSO_4$ gef.: 0,0542 = 46,0% Ba.
Berechnet: 44,13%.

Bei der großen Schwierigkeit der Reinigung und den äußerst schlechten Ausbeuten zeigen die Analysendaten verhältnismäßig große Abweichungen von den berechneten Daten, aber sie bestätigen trotzdem einwandfrei, daß als einzige höhere flüchtige Fettsäure aus Alkohol Buttersäure entsteht. Die nach den Analysen noch in Frage kommende Valeriansäure bildet ein charakteristisches, von dem der Buttersäure in der Krystallform (Blättchen) abweichendes Silbersalz, das bei den Entladungsversuchen niemals beobachtet wurde.

Daß auch die Buttersäuresynthese ein umkehrbarer Prozeß ist, dafür spricht, wie beiläufig erwähnt werden soll, das Verhalten der wässerigen (40%) Buttersäure bei der Entladung. Durch die sehr langsam verlaufende Zersetzung bei der Siedetemperatur entstehen Wasserstoff, Kohlenoxyd und Kohlenwasserstoffe.

Über die Aufnahme des Stickstoffs durch Alkohol unter dem Einfluß der stillen Entladung.

Von

Walther Löb.

(Aus der chemischen Abteilung des Virchow-Krankenhauses in Berlin.)

(Eingegangen am 6. Juli 1909.)

Mit 1 Figur im Text.

Die Versuche Berthelots über die Fixierung des Stickstoffs durch eine große Anzahl organischer Substanzen, wie Alkohole, Säuren, Aldehyde, Amine, Kohlenhydrate usw. unter dem Einfluß der Entladung sind bisher von keiner Seite aufgenommen worden. Wegen der großen Bedeutung derartiger Reaktionen für biologische Probleme habe ich vor einer Reihe von Jahren, nachdem die Nachahmung der Kohlensäureassimilation mit Hilfe der gleichen Energieform geglückt war, eine Wiederholung, Prüfung und genauere Durcharbeitung des von Berthelot nur ganz oberflächlich untersuchten Gebietes begonnen. Dabei stieß ich aber sogleich auf so komplizierte Verhältnisse und experimentelle Schwierigkeiten, daß ich alsbald gezwungen wurde, erst die einfacheren Fragen zu erledigen, bevor ich mit Aussicht auf Erfolg an die Berthelotschen Beobachtungen — ihre Richtigkeit vorausgesetzt — herantreten konnte.

Berthelot hatte aus den Gasanalysen vor und nach der Einwirkung der Entladung, aus den Volumina des absorbierten Stickstoffs und der entwickelten Gase, wie CO, CO_2, H_2, Bruttoformeln für die resultierenden Verbindungen, ohne diese überhaupt zu isolieren, aufgestellt. Selbstverständlich fallen alle seine auf die Gasanalysen gestützten Annahmen, wenn es sich herausstellt, daß nicht eine Verbindung entsteht, sondern mehrere. In solchen Fällen ist jeder Schluß aus dem absorbierten Stick-

stoffvolumen auf die Zusammensetzung der entstandenen Substanzen unmöglich. Ich begann damals die Untersuchung mit der Einwirkung des Stickstoffs auf Alkohol, der in Gegenwart von Kohlensäure leicht in Glykolaldehyd und Zucker[1]) übergeht, in der Hoffnung, eine einfache Synthese von Aminoverbindungen zu erreichen und das Eingreifen des Stickstoffs mit dem Aufbau der Kohlenhydrate genetisch zu verknüpfen. Nun liefert aber der Alkohol durch die Entladung neben anderen Stoffen reichlich Wasserstoff, so daß zunächst die Aufgabe, das Verhalten von Stickstoff und Wasserstoff unter dem Einfluß der stillen Entladung festzustellen, erledigt werden mußte. Ferner war, um den Anschluß der Reaktionen an biologische Verhältnisse zu wahren, die Rolle des Wassers zu berücksichtigen, eine Untersuchung, die weiter zur Prüfung des feuchten Stickstoffs und der Stickoxyde[2]) führte. Außer Wasserstoff entsteht aus dem Alkohol Aldehyd, dieser zerfällt in Methan und Kohlenoxyd. Das Verhalten aller dieser Stoffe muß man kennen, bevor eine Beantwortung der Frage möglich ist, in welcher Form Alkohol den Stickstoff aufnimmt und welche Verbindungen entstehen.

Man sieht schon aus diesen Überlegungen, daß man der Schlußweise von Berthelot[3]):
„Angewandt 0,056 g Alkohol und 19,1 ccm Stickstoff. Erhaltenes Gas: $H_2 = 26{,}8$ ccm, $CO_2 = 0{,}2$ ccm, $N_2 = 8{,}2$ ccm; absorbierter Stickstoff: 10,9 ccm. Diese Werte entsprechen dem Vorgang:

$$C_2H_5OH - H_2 + 0{,}8\,N,$$

woraus sich, bei Berücksichtigung des ohne Stickstoffabsorption zersetzten Alkohols, die Bildung eines Amidins von der Formel ergibt:

$$C_4H_8N_2O_2 = [C_2H(OH)NH_2]_2{'}$$

sehr skeptisch gegenüberstehen muß.

In der Tat liegen die Verhältnisse bei dem Alkohol und sämtlichen von mir bisher untersuchten Substanzen anders, als Berthelot annahm. Die Reaktionen verlaufen einerseits komplizierter, andererseits weit einfacher. Komplizierter dadurch,

---

1) Zeitschr. f. Elektrochem. 12, 282, 1906.

2) Zeitschr. f. Elektrochem. 14, 556, 1908.

3) Compt. rend. 126, 616, 1898.

daß stets eine Reihe von Substanzen nach weitgehender Zersetzung des Ausgangsmaterials entsteht, einfacher dadurch, daß — wenigstens in den von mir untersuchten Fällen — die Fixierung des Stickstoffs stets auf der zunächst eintretenden Bildung von Ammoniak beruht. Erst das Ammoniak, nicht der freie Stickstoff, tritt je nach der chemischen Natur der im Reaktionsgemisch vorhandenen Körper mit diesen in Reaktion. So bildet sich aus feuchtem Stickstoff, Wasserstoff und Kohlenoxyd — ameisensaures Ammonium und Hexamethylentetramin neben den anderen ohne Mitwirkung des Stickstoffs entstehenden, früher schon angegebenen Substanzen. Die Ammoniakbildung verläuft in diesem Gemisch viel langsamer als die Ameisensäurebildung, die Formaldehydsynthese und weitere an diese Reaktionen sich anschließende Vorgänge. Ähnlich verläuft der Prozeß in Gegenwart von Kohlensäure. Stickstoff und Wasserstoff liefern Ammoniak, aus feuchtem Stickstoff allein entstehen Ammoniumnitrit neben Nitrat; Kohlenoxyd und Stickstoff verhalten sich ohne Wasserstoff wie in seiner Gegenwart, da durch die Reaktion:

$$CO + H_2O = CO_2 + H_2$$

Wasserstoff stets auftritt.

Über eine Anzahl dieser Reaktionen habe ich bereits im vergangenen Jahre kurze Mitteilung gemacht.[1])

Nach Erledigung dieser Vorstudien war in etwa vorauszusehen, in welcher Weise Alkohol mit Stickstoff reagiert. Der Stickstoff wird nicht als solcher fixiert, sondern bildet mit dem reichlich auftretenden Wasserstoff zunächst Ammoniak. Dabei hat der Alkohol die Spaltung in

$$CH_3CHO + H_2$$

erlitten, und es besteht die Möglichkeit, daß Ammoniak mit Aldehyd in Wechselwirkung tritt. Da aber der Aldehyd weiter in CH_4 und CO gespalten wird, so setzt alsbald die Formaldehydbildung ein, so daß das Ammoniak als Hexamethylentetramin gebunden wird. In Gegenwart von Wasser führt außerdem die Ameisensäurebildung die Entstehung ihres Ammoniumsalzes herbei. Schließlich tritt noch Buttersäure[2]) auf, die nach Maß-

[1]) Zeitschr. f. Elektrochem. 14, 556, 1908.

[2]) Diese Zeitschr. 20, 125, 1909.

gabe ihrer Acidität und der Menge des Ammoniaks gleichfalls zur Salzbildung befähigt ist.

Das Gleichgewicht für die Ammoniakbildung aus Stickstoff und Wasserstoff liegt für jene sehr ungünstig. Da aber das entstehende Ammoniak dauernd gebunden wird, so kann man trotzdem durch entsprechend lange Dauer der Versuche eine zum Nachweis genügende Menge der Stickstoffverbindungen erhalten. Daß durch die Entladungsreaktionen aus einfachsten Ausgangsstoffen eine Aminosäure, deren Bildung besonderes Interesse besitzt, dargestellt werden kann, halte ich für wahrscheinlich. Andeutungen für ihr Auftreten habe ich häufig beobachtet; jedoch handelte es sich immer nur um Spuren, die einen sicheren Schluß nicht erlaubten. Wenn es gelingt, die Reaktion

$$2CO_2 + 2H_2O = CH_2OHCHO + 2O_2$$

mit Hilfe des Ammoniaks und unter Mitwirkung des Sauerstoffs in dem Sinne weiter zu führen:

$$CH_2OHCOOH + 2NH_3 = NH_2CH_2COONH_4 + H_2O,$$

dann wäre eine Synthese des Glykokolls aus den Bestandteilen der atmosphärischen Luft direkt durchführbar. Diesem Ziele glaubte ich oft nahe zu sein, jedoch konnte ich meine Beobachtungen noch nicht durch analytische Daten sicher stellen.

Versuche.

Die Anordnung des Elektrisators unterscheidet sich von früheren Formen durch seine Dimensionen (Wandabstand) und durch die Einrichtung einer dauernden Kühlung des Entladungsraumes. Es erwies sich bei der Anwendung des Rotax-Unterbrechers und der in der Arbeit über die Bildung der Buttersäure[1]) beschriebenen Stromverhältnisse zweckmäßig, dem zur Untersuchung feuchter Gase schon früher[2]) benutzten Elektrisator einen Wandabstand von 4 mm zu geben, da bei geringerer Entfernung sich die Funkenbildung nicht ausschließen ließ. Zur Kühlung enthielten die als Elektroden verwandten Elektrolyte (Kochsalzlösungen) Glaskühler, und zwar der Außenelektrolyt ein Schlangenkühler, der Innenelektrolyt einen dünnwandigen Innenkühler. Beide Kühler standen unter sich und mit der Wasserleitung in Verbindung.

Die Anordnung des Elektrisators, dessen Länge wie die des früher benutzten 42 cm betrug, geht aus der Figur 1 hervor. Wie in der Zeichnung angedeutet, war der Entladungsraum des Elektrisators von Stickstoff

---

[1]) Diese Zeitschr. 20, 131, 1909.

[2]) Zeitschr. f. Elektrochem. 12, 282, 1906.

erfüllt, während die Flüssigkeit nur bis zur Erweiterung des gebogenen Glasrohres reichte. Trotz der Verhinderung einer irgendwie wesentlichen Temperaturerhöhung — die Temperatur der Elektrolyten stieg nicht über 20° — war stets genügend Alkoholdampf vorhanden, um dessen Zersetzung zur vorherrschenden zu machen.

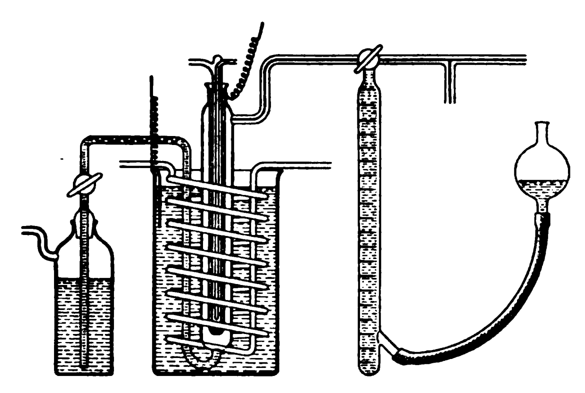


Fig. 1.

Der Stickstoff wurde nach bekannter Vorschrift durch Zersetzung von Ammoniumnitrit gewonnen und über Wasser im Gasometer aufbewahrt. Nach Füllung des Elektrisators mit 95%igem Alkohol drückte man aus dem Azotometer ein gemessenes Volum Stickstoff in den Entladungsraum, wobei der Alkohol in die Vorratsflasche zurückgedrängt wurde. Während des Versuchs blieben die Glashähne verschlossen, so daß etwaige Druckschwankungen sich nicht ausgleichen konnten. Nach mehrstündiger Einwirkung der Entladung wurde der Versuch unterbrochen, das Gas in die Bürette zur Analyse gezogen, so daß der Alkohol den Elektrisator wieder ganz erfüllte, und dann eine neue Quantität Stickstoff in gleicher Weise wie die erste zugeführt. Durch oftmalige Wiederholung dieser Prozedur trat eine Anreicherung der nicht gasförmigen Zersetzungsprodukte auf, die eine genauere Bearbeitung der Reaktion erst ermöglichte.

Nach Abschluß des Versuches roch die aus dem Elektrisator in das Vorratsgefäß gedrückte Flüssigkeit nach Acetaldehyd, reagierte sauer und zeigte die Formaldehydreaktionen[1]) intensiv.

Zunächst wurden die flüchtigeren Produkte, Acetaldehyd, Alkohol, etwas Formaldehyd und Ameisensäure bei 80° aus dem Wasserbad abdestilliert. Das Destillat gab beim Erhitzen mit Natronlauge kein Ammoniak. Wohl aber der Destillationsrückstand, der stark sauer reagierte und mit Wasserdampf reichlich freie Ameisensäure und Formaldehyd, aber keine Essigsäure lieferte. Auch dieses Destillat erwies sich als frei von Stickstoffverbindungen.

[1]) Zeitschr. f. Elektrochem. 12, 282ff.

Beim Eindampfen des nichts Flüchtiges mehr enthaltenden, schwach gelb gefärbten Destillationsrückstandes hinterblieb ein gelber Sirup in geringer Menge, der mit Natronlauge reichlich Ammoniak entwickelte und Zuckerreaktionen, aber keine Formaldehydreaktionen mehr gab. Durch Anreiben mit absolutem Alkohol wurden weiße Krystalle gewonnen, die nach allen Reaktionen aus ameisensaurem Ammonium bestanden, dem nach dem beim Aufkochen mit Säuren auftretenden Geruch und den Ergebnissen anderer Versuche[1]) zweifellos buttersaures Ammonium beigemengt war.

Das alkoholische Filtrat der Salze gab mit Natronlauge beim Erwärmen Ammoniak und nach dem Aufkochen mit verdünnter Schwefelsäure und Wasserdampfdestillation im Destillat die Formaldehydreaktionen, wodurch auch die Bildung von Hexamethylentetramin erwiesen ist.

In einigen Versuchen wurde aus dem alkoholischen Filtrat das Platindoppelsalz der Base dargestellt; es ließ sich jedoch nicht frei von Salmiakplatinchlorid gewinnen, so daß ich auf die Wiedergabe der Analysen verzichte.

Bei der geringen Ausbeute — aus einem 30stündigen Versuch wurden 1,3 bis 1,5 g an nicht flüchtigen Substanzen, in denen der ganze Stickstoff enthalten war, gewonnen — mußte auf eine auch nur annähernd quantitative Bestimmung der Einzelausbeuten verzichtet werden.

Nr. des Versuches	Stromstärke im Primärkreis Amp.	Rotax-Stellung	Dauer in Stund.	Stickstoff angewandt ccm	Resultierendes Gas: Gesamtmenge ccm	CO_2 ccm	CO ccm	H_2 ccm	Stickstoff absorbiert ccm
1	1,5	3	$3^2/_3$	50	60,7	2,1	0,5	26,7	19,6
2	"	"	$3^1/_2$	"	67,6	0,4	4,2	30,5	17,9
3	"	"	$2^3/_4$	"	74,8	0	4,4	25,4	6,0
4	"	"	$3^1/_2$	"	65,0	0,7	0,9	31,8	20,6
5	"	"	$3^2/_3$	"	63,8	0	2,7	32,2	23,8
6	"	"	$4^2/_3$	"	65,6	0,1	5,2	34,4	25,2
7	"	"	$3^5/_6$	"	71,2	0,6	5,4	33,0	18,8
8	"	"	$3^1/_2$	"	76,0	0	7,4	31,4	14,2
9	"	"	$3^{55}/_{60}$	"	71,4	0,3	4,3	30,9	14,8
10	"	"	$5^1/_{12}$	"	62,2	0,3	3,4	37,0	29,5
	"	"	$5^1/_3$	"	66,4	0,3	1,9	37,7	24,5
Summe			$43^1/_2$	550	744,7	4,8	38,3	351,0	214,9

Der Verlauf der Stickstoffabsorption läßt sich am besten am Stande der Gasanalysen verfolgen. Sie ist, wie die folgende Tabelle zeigt, bei annähernd gleichen Strombedingungen eine Funktion der Zeit. Dadurch, daß der Stickstoff in nicht flüchtiger Form gebunden wird, entzieht er sich

[1]) Diese Zeitschr. 20, 125, 1909.

nach seiner Fixierung der weiteren Einwirkung der Entladung. Ich beschränke mich auf die Wiedergabe nur einer Versuchsreihe, weil viele andere mit Wechsel der Konzentrationsverhältnisse des Alkohols von 50% bis 100% und Abänderung der Strombedingungen keine anderen Resultate und keine besseren Ausbeuten ergaben.

Außer den angegebenen Gasen waren stets einige Zehntel Kubikzentimeter an Kohlenwasserstoffen entstanden, auf deren Wiedergabe verzichtet ist, da sie für die Frage der Stickstofffixierung ohne Bedeutung sind. Ein Zusammenhang der letzteren mit den Wasserstoff- und Kohlenoxydwerten läßt sich nicht erkennen. Offenbar schreitet die Alkoholzersetzung und die sich an sie anschließenden synthetischen Reaktionen unabhängig von der Ammoniakbildung fort. In der Stickstoffabsorption ist gleichzeitig ein Maß für die Menge des entstandenen Ammoniaks gegeben.

In der folgenden Tabelle sind die Werte des absorbierten Stickstoffs und des entwickelten Wasserstoffs und Kohlenoxyds nach steigenden Zeiten geordnet zusammengestellt.

Nr.	Dauer in Stunden	Stickstoff absorbiert ccm	Wasserstoff entwickelt ccm	Kohlenoxyd entwickelt ccm
3	$2^{3}/_{4}$	6,0	25,4	4,4
2	$3^{1}/_{2}$	17,9	30,5	4,2
8	$3^{1}/_{2}$	14,2	31,4	7,4
4	$3^{1}/_{2}$	20,6	31,8	0,9
1	$3^{2}/_{3}$	19,6	26,7	0,5
5	$3^{2}/_{3}$	23,8	32,2	2,7
7	$3^{5}/_{6}$	18,8	33,0	5,4
9	$3^{55}/_{60}$	14,8	31,4	7,4
6	$4^{2}/_{3}$	25,2	34,4	5,2
10	$5^{1}/_{12}$	29,5	37,0	3,4
11	$5^{1}/_{3}$	24,5	37,7	1,9

Es lag wegen des primären Zerfalls des Alkohols in Wasserstoff und Aldehyd nahe, auch letzteren in Gegenwart von Stickstoff der Wirkung der Entladung auszusetzen. Die Resultate werden den Gegenstand einer besonderen Mitteilung bilden. Nur so viel soll hier schon erwähnt werden, daß die Stickstoffabsorption durch ihn etwa doppelt so groß ist, wie durch Alkohol (in 29 Stunden rund 300 ccm), woraus hervorgehen dürfte, daß letzterer erst nach seiner Spaltung in Aldehyd und Wasserstoff den Stickstoff als Ammoniak fixiert. Auch bei Verwendung des Acetaldehyds ließ sich die Gesamtmenge des absorbierten Stickstoffs durch Natronlauge als Ammoniak in Freiheit setzen. Der zu seiner Bildung erforderliche Wasserstoff wird durch die leicht eintretende Zersetzung des aus dem Acetaldehyd neben Kohlenoxyd entstehenden Methans geliefert.

Das Wasser im Muskel.

Von

H. W. Fischer und P. Jensen.[1])

(Aus dem physikalischen und physiologischen Institut der Universität Breslau.)

Mit 5 Figuren.

(Eingegangen am 16. Juni 1909.)

In dieser Zeitschrift machte vor kurzem der eine von uns gemeinsam mit Otto Bobertag (18, 58) über einige Versuche Mitteilung, bei denen aus der Abkühlungskurve einer kolloidalen Lösung Schlüsse über die Bindung des darin enthaltenen Wassers gezogen wurden. Wir hatten damals auf die physiologische Anwendbarkeit der Methode hingewiesen, und da Herr Prof. Dr. Jensen gerade ähnliche Fragen am Muskel zu bearbeiten begonnen hatte, so machte er mir den Vorschlag, die ferneren Versuche gemeinsam auszuführen.

Um noch einmal kurz an die frühere Anordnung zu erinnern: Sie beruhte darauf, daß gleichzeitig zwei Gefäße der Abkühlung unterworfen wurden, von denen das eine das Lösungsmittel und das andere das Lösungsmittel und eine geringe Menge Kolloid enthielt; hatten nun die Gläser die gleichen Abmessungen, Füllungen usw., so mußten sie sich auch gleich schnell abkühlen, etwaige Differenzen der Kurven wurden der Wirkung einer Veränderung des Zustandes des Kolloides zugeschrieben,

---

[1]) Die folgenden Versuche sind von Herrn Dr. Fischer und mir gemeinsam ausgeführt worden. Da wir aber nicht immer dieselben Absichten verfolgten und uns auch an verschiedene Kreise von engeren Fachgenossen wenden, so haben wir uns entschlossen, daß jeder von uns an besonderem Orte über unsere Versuche berichte. Hier berichtet zunächst Herr Dr. Fischer. Ich selbst habe bei der diesjährigen Tagung der Deutschen physiologischen Gesellschaft in Würzburg über unsere Versuche vorgetragen und werde demnächst an anderer Stelle eine ausführlichere Mitteilung machen. P. Jensen.

dessen sonstiger Einfluß gegenüber der großen anwesenden Menge Lösungsmittel wohl vernachlässigt werden konnte. Dementsprechend war auch die Genauigkeit der Temperaturmessung nur gering. Damals suchten wir nach den durch die Capillaritätstheorie vorhergesagten großen Störungen. Unter solchen Umständen läßt sich natürlich eine Ungenauigkeit von einigen Prozenten ertragen, dagegen läßt sich ein Gehalt von etwa 20 °/₀ Kolloid bei Messungen, die dazu gemacht werden, um feine Einwirkungen und Störungen festzustellen, selbstverständlich nicht mehr vernachlässigen. Durch ein kompensatorisches Verfahren läßt sich die Störung nicht beseitigen, sondern ihr Betrag muß rechnerisch ermittelt werden.

Ich denke mir einen Körper von regelmäßiger Form von einem gegenüber seiner inneren Wärmeleitfähigkeit ungeheuer großen Wärmewiderstand umgeben und in ein Bad von konstanter Temperatur eingesenkt. Dann wird zu jeder Zeit im ganzen Inneren des Körpers praktisch dieselbe Temperatur herrschen.

Die in der Zeiteinheit hinausströmende Wärmemenge wird seiner Oberfläche o und der Temperaturdifferenz gegen das Bad ϑ direkt, und die dadurch hervorgebrachte Temperaturänderung $d\vartheta$ der vorhandenen Masse m, der spezifischen Wärme σ umgekehrt proportional sein.

Ist nun v das Volumen und s das spezifische Gewicht, so ist ersichtlich $v \cdot s = m$, so daß ich die Formel erhalte:

$$\frac{d\vartheta}{dt} = \frac{o}{v} \cdot \frac{L}{s \cdot \sigma} \cdot \vartheta .$$

Der erste Faktor des Produktes auf der rechten Seite bedeutet den Einfluß der geometrischen Gestalt und der zweite den der physikalischen Beschaffenheit auf die Abkühlungsgeschwindigkeit.

Wir wollen uns zunächst mit dem ersten Faktor $\frac{o}{v}$ in einem Spezialfalle, nämlich wenn der Körper ein Zylinder, dessen Radius klein gegen seine Länge ist, beschäftigen. In diesem Falle ist

$$\frac{o}{v} = \frac{2\pi r h}{\pi r^2 h} = \frac{2}{r},$$

die Abkühlungsgeschwindigkeit ist also in diesem Falle dem Radius umgekehrt proportional und von der Länge des Zylinders praktisch unabhängig. Daraus folgt, daß es für die Vergleichbarkeit von Versuchen von allergrößter Wichtigkeit ist, daß der Radius der benutzten Gefäße vollkommen gleich ist, auf die Gleichheit der Höhen der Füllung kommt es sehr viel weniger an.

Nun sind Muskel freilich keine sehr langen Zylinder, doch bleiben auch bei Zylindern, deren Deckel und Bodenfläche nicht gegenüber der sonstigen Oberfläche vernachlässigt werden kann, bei nicht gar zu großen Veränderungen der Länge die Verhältnisse ziemlich dieselben, so daß das wichtige Verhältnis von $\frac{o}{v}$ (wobei diesmal auch der Boden und Deckel mit gerechnet ist) bei einem 3 resp. 4 cm langen Zylinder von dem

Radius 3,5 mm sich nur wie 67 zu 63 verhält. Die Höhe der Füllungen braucht also nicht genau gleich zu sein, dagegen aber die Radien der Gefäße, was, wie wir sehen werden, experimentell wichtig ist.

Wir kommen jetzt auf den Einfluß einer Beimengung des Kolloides auf die in einem bestimmten Temperaturintervalle abgegebene Wärmemenge, d. h. auf den zweiten Faktor $\frac{L}{s \cdot \sigma}$. Hier bedeuten s resp. σ das spezifische Gewicht resp. Wärme der kolloidalen Lösung. Nun ist bei kolloidalen Gebilden, z. B. Muskeln s größer, dafür aber σ (wegen der hohen spezifischen Wärme des Wassers) kleiner wie bei Wasser, so daß $s \cdot \sigma$ im allgemeinen etwas kleiner ist wie bei Wasser. Die Abkühlungskurve müßte also steiler abfallen wie die der damit verglichenen Menge Wasser. Fällt sie aber weniger steil ab, so ist das ein Zeichen, daß in dem kolloiden Gebilde ein Vorgang verläuft, der Wärme liefert.

Die Bedeutung der zwischen der Abkühlungskurve einerseits und zwei Werten von ϑ und der Zeitachse eingeschlossenen Fläche anderseits ist die einer Wärmemenge. Läuft nun die Abkühlungskurve der Zeitachse parallel, d. h. passiert die Substanz einen Gefrierpunkt, so ist der Inhalt der Fläche $\vartheta \cdot (t_1 - t_2)$ (worin t_2 resp. t_1 die Zeit des Endes resp. Beginnes des Gefrierens bedeutet) der Schmelzwärme proportional. Füge ich jetzt zu der Substanz einen Zusatz, so hat $s \cdot \sigma$ (worin σ nunmehr die Schmelzwärme bedeutet), da $s = \frac{m}{v}$ ist, den Wert der Schmelzwärme des pro Volumeneinheit vorhandenen Wassers. Das Stück $t_2 - t_1$ wird also in seiner Länge der pro Volumeneinheit vorhandenen Menge Wassers proportional sein, da sich ja der andere Faktor des Produktes, ϑ, nicht ändert.

Die Versuchsanordnung mußte diesen theoretischen Überlegungen entsprechend abgeändert werden. Gearbeitet wurde mit den Gastrocnemien von Fröschen, wobei möglichst große Exemplare zu den Versuchen ausgewählt wurden. An die präparierten Sehnen am oberen und am unteren Ende wurde je ein Seidenfaden angebunden, der zum Hinein- oder Herausziehen des Muskels in das Röhrchen diente. Dieses war etwas enger als der Muskel an seiner dicksten Stelle, unten konisch ausgezogen und offen, so daß der Muskel beim Hineinziehen sanft gestreckt wurde und sich überall an die Glaswand anlegte. Der untere Faden wurde dann abgeschnitten, die Öffnung mit einem kleinen Kork verschlossen und zur weiteren Sicherheit noch mit einem Gummikitt umschmolzen. Wo wir anders vorgegangen sind, werden wir das seines Ortes angeben. Dieses Röhrchen wurde dann in ein nicht ausgepumptes unversilbertes Dewargefäß, das den schon in der vorigen Arbeit besprochenen großen Wärmewiderstand repräsentiert, zentrisch durch einen Korken befestigt.

Wir haben es vorgezogen, nicht Parallelversuche anzustellen, sondern die Kurven der zu vergleichenden Substanzen einzeln aufzunehmen. Denn erstens ist es schwierig, Röhrchen mit absolut gleichem Radius zu finden — schwankt er doch an demselben Glasrohre oft um mehr als 15 % —, während bei Hintereinanderaufnahmen in demselben Röhrchen dadurch natürlich kein Fehler entstehen kann. Zweitens kam es uns diesmal darauf an, die Kurven so leicht lesbar wie irgend möglich zu erhalten, und dabei hätte das „dritte Temperaturgefälle" gestört.

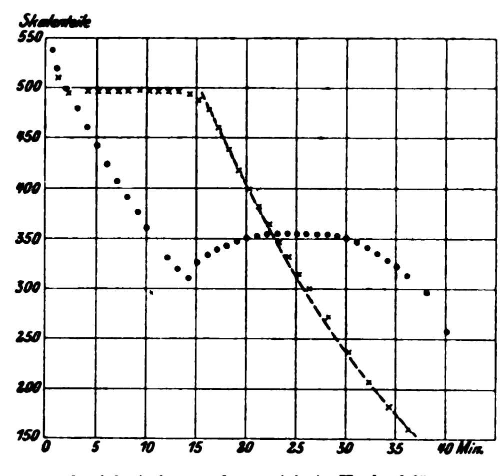
Natürlich hat diese Arbeitsmethode zur Voraussetzung, daß es einem möglich ist, bei verschiedenen Versuchen die Badtemperatur exakt zu reproduzieren. Wir benutzten ein Bad von Äther und fester Kohlensäure, das sich in einem großen Dewarzylinder befand, der die Temperatur ausgezeichnet hielt. Ein nach Stock mit verdünntem Schwefelkohlenstoffdampf gefüllter Zylinder zeigte sich bei — 76° wenig brauchbar. Die Temperaturmessung erfolgte wieder durch nadelförmige Thermoelemente, die Ablesung an einem eigens für thermoelektrische Messungen eingerichteten d'Arsonval-Galvanometer mit Fernrohr und Skala. Vor dieses Galvanometer wurde ein so großer Widerstand eingeschaltet, daß der Ausschlag, wenn die Thermonadel in das Kältebad gebracht wurde, 500 Skalenteile betrug, d. h. daß dann auf der Skala *O* abgelesen wurde. Die abgelesenen Zahlen sind also direkt den Differenzen gegen die Badtemperatur proportional.

Da nun die von uns im folgenden untersuchten Objekte mit physiologischer Kochsalzlösung isoosmotisch sind, so empfahl es sich, zunächst deren Gefrierkurve aufzunehmen. Diese sollte nach der Theorie folgendermaßen aussehen:

Nach Eintritt des Gefrierens läuft die Kurve, während das Wasser ausfriert und der Rest immer konzentrierter an Kochsalz wird, zunächst eine Zeitlang der *t*-Achse fast parallel, um sich zuerst langsam, dann immer schneller von ihr zu entfernen, bis schließlich am kryohydratischen Punkte noch ein zweiter Gefrierpunkt, der der gesättigten Salzlösung, auftreten müßte. Die Kreuzkurve des Blattes I zeigt das wirklich erhaltene Resultat: Während zwar im oberen Teile sich in der langsamen Trennung die theoretische Vorhersage bestätigt,

so ist dagegen im unteren Teile nirgends ein kryohydratischer Punkt zu finden.

Um die Ursache dieser Erscheinung kennen zu lernen, nahmen wir die Kurve einer konzentrierten Kochsalzlösung auf, die Punktkurve des Blattes I. Zunächst tritt eine gewaltige



× physiologische, • konzentrierte Kochsalzlösung.

Fig. 1.

Unterkühlung ein, die sich nur langsam wieder aufhebt, so daß die Kurve eine ganze Reihe von Minuten braucht, um wieder auf den kryohydratischen Punkt zu kommen.

Die Krystallisationsgeschwindigkeit des Eises scheint unter diesen Umständen nicht sehr groß zu sein. Nun wird es auch ohne weiteres verständlich, warum wir von dem kryohydratischen Punkte der physiologischen Kochsalzlösung wenig merken. Die beim Gefrieren des geringen Wasserrestes freiwerdende geringe Wärmemenge tritt nicht mit einem Schlage auf (in diesem Falle hätten wir sie bemerken müssen), sondern während einiger Minuten. So wird der Temperaturabfall nicht sehr aufgehalten. Erst beim schärferen Ansehen der Kurve zeigt sich, daß ihre Krümmung dicht unter dem kryohydratischen Punkte keine gleichmäßige ist. Interpoliert man nämlich mit Hilfe eines verbiegbaren Kurvenlineales aus den oberen und den unteren Werten eine gleichmäßig verlaufende Kurve, so sieht man, daß die nächsten unter dem kryohydratischen Punkte gelegenen

Werte zu weit nach rechts liegen, was auf einen wärmeliefernden Vorgang hindeutet.

Nach diesen Vorversuchen gingen wir zur Untersuchung von Froschmuskeln über. Wir wollen aber hier zunächst einige Bemerkungen machen, die für alle folgenden Kurven gelten. Da man die Länge der horizontalen Stücke miteinander vergleichen will, so braucht man einen festen Punkt in der Gefrierkurve, nach dem man die koordinierten Zeiten zusammenlegen kann. Dafür ist natürlich der Beginn des Gefrierens besonders geeignet. Nun läßt er sich aber aus der Kurve nicht ohne weiteres feststellen. Jede Kurve zeigt eine geringe Unterkühlung.

Wir haben nämlich sehr auffallender Weise niemals starke Unterkühlungen beobachten können, sondern nur solche von einigen zehntel Graden. Das widerspricht durchaus den in der Literatur niedergelegten Erfahrungen und auch denen, die Herr Jensen gelegentlich früherer thermometrischer Messungen machte, bei denen Unterkühlungen bis 7° vorkamen. Die Ursachen dieser Erscheinung sind nach Herrn Prof. Jensens Meinung in dem bekannten Unterschiede, den die Muskeln von Kalt- und Warmfröschen gegen einander zeigen, zu suchen.

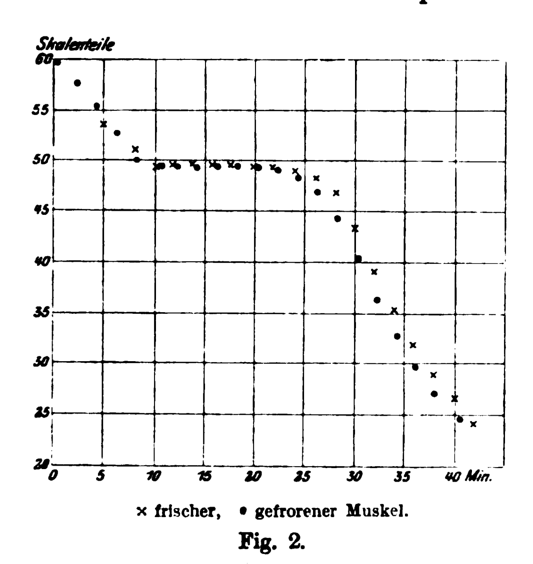
Ich möchte in der Verwendung der enganliegenden Glasröhren die Ursache sehen. Die Wände werden nämlich beim Hineinziehen etwas feucht. Dieses an der Glaswand anhaftende Wasser gefriert natürlich bald, da es sich wegen seiner großen Oberfläche und kleinen Masse sehr schnell abkühlt. Durch die an der Wand fortwachsenden Krystalle wird der Muskel geimpft. Wegen der zuerst vorhandenen nur geringen Anzahl von Keimen kann es trotzdem noch zu einer geringen Unterkühlung kommen. Wie wir mit einem frei an der Thermonadel aufgespießten Muskel arbeiteten, fanden wir eine größere Unterkühlung. Außerdem liegt bei allen Kurven der der Unterkühlung unmittelbar vorhergehende Wert etwas zu hoch.

Der Fixpunkt muß also künstlich geschaffen werden. Wir haben ihn durch graphische Interpolation ermittelt, und zwar als den Schnittpunkt des horizontalen Stückes mit dem vor dem Gefrierpunkte gelegenen Teile. Man kann ganz ruhig mit dem Lineal interpolieren, da man ja zur Interpolation nur ein so kleines Temperaturintervall benützt, daß sich in diesem die

treibende Kraft nicht erheblich ändert. Der unterste Wert muß aus dem Grunde, den wir vorhin angegeben haben, etwas oberhalb der Geraden liegen bleiben. Dieses Ineinanderrücken ermöglicht es einem auch, sich ein Urteil über die Verläßlichkeit der Kurven zu bilden. Sie müssen in dem vor dem Gefrierpunkte liegenden Teile ineinander laufen. Kurven, bei denen das nicht der Fall ist, enthalten eine Störung, zeigen dann auch stets im weiteren Verlaufe eine Beeinflussung in gleichem Sinne und wurden daher als unbrauchbar verworfen.

Wie genau diese Forderung erfüllt wird, davon kann man sich namentlich bei den beiden folgenden Blättern überzeugen, bei denen die Werte verschiedener Kurven so liegen, als ob sie zu einem Kurvenzuge gehörten.

Blatt II zeigt in der oben angegebenen Art gezeichnete Kurven. Die Kreuzkurve gibt die beim Gefrieren eines frischen Muskels erhaltenen Zahlen wieder. Einige Zeit nach dem Auftauen wurde der Muskel totenstarr und preßte eine erheb-



× frischer, • gefrorener Muskel.

Fig. 2.

liche Menge Wasser aus. Nach diesem Befunde hätte man eine Abnahme des im Kolloid gebundenen Wassers erwarten sollen. Zu unserem großen Erstaunen zeigte die gepunktete Kurve, die mit dem aufgetauten Muskel aufgenommen wurde, eine merkliche Verkürzung des horizontalen Stückes, also eine

Abnahme des freien Wassers. Dafür hat sie aber in dem abfallenden Teile eine geringere Neigung, also einen Wärme liefernden Vorgang.

Das heißt: Nach oder bei der Abtötung durch das Gefrieren verläuft ein Vorgang, durch den Wasser in eine nicht näher bekannte Bindung eintritt, aus der es erst bei tieferen Temperaturen wieder frei wird. Der Gesamtinhalt eines Muskels an Wärme nimmt bei der Abtötung durch Gefrieren ab.

Tabelle I zu Blatt II.

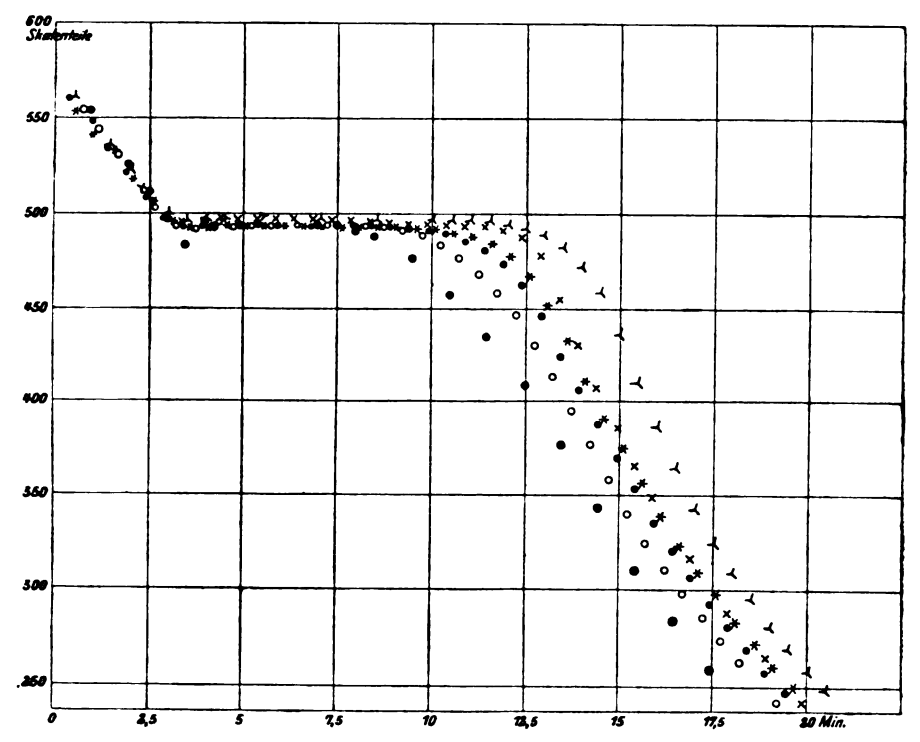
Muskel. Gastrocnemius v. Rana esculenta.

Frisch — Gefroren.

t	Frisch	Bem.	t	Gefroren	Bem.
10h 19,5	512,0	Badtemp. —74°	11h 0,5	598,0	Badtemp. —73°
20,5	497,2		1,5	577,0	
21,5	497,2		2,5	555,0	
22,5	497,2		3,5	529,0	
23,5	497,2		4,5	503,0	
24,5	496,8	0 = 501	5,5	497,0	
25,5	496,3		6,5	497,0	0 = 501
26,5	494,5		7,5	497,2	
27,5	491,5		8,5	497,0	
28,5	484,5		9,5	497,0	
29,5	469,5		10,5	495,8	
30,5	436		11,5	492,5	
31,5	392,5		12,5	486	
32,5	355		13,5	472	Nullp. 502
33,5	320		14,5	446	
34,5	290		15,5	404	
35,5	265		16,5	364	
36,5	241		17,6	329	
			18,5	299	
			19,5	272	Bad —72°
			20,5	248	

Dieses unerwartete Ergebnis ließ uns zuerst an einen Fehler in der Methode denken, nach welchem wir aber erfolglos gesucht haben. Dann überzeugten uns die auf Blatt III dargestellten Kurven in ihrer Gesamtheit von der Zweifellosigkeit der Tatsache, daß je nach dem Grade der Zerstörung die Menge des im Muskel gebundenen Wassers wächst.

Die λ-Kurve ist diesmal die Kurve einer physiologischen Kochsalzlösung, dieser am nächsten steht die Kurve des frischen Muskels, wieder energieärmer und reicher an gebundenem Wasser scheinen die beiden Kurven mehrmals gefrorener Muskeln zu sein. Die Menge des ausgepreßten Wassers vermehrt sich nach jedem Ausfrieren.



× Muskel frisch, • 1 mal gefroren, • 2 mal gefroren, o auf 100° gebracht, ⊚ zerkocht, Y physiologische Kochsalzlösung.

Fig. 3.

Noch stärkere Abweichung zeigt die Kurve eines auf 100° gebrachten Muskels, bei welcher Operation aus dem bei der Totenstarre ausgepreßten Safte große Mengen von Eiweißstoffen ausfielen. Das Versuchsgefäß wurde dabei durch ein übergeschobenes Glasrohr geschützt in siedendes Wasser gesenkt. Bis hierhin ist es stets derselbe Muskel, an dem hintereinander im Versuchsröhrchen die verschiedenen Operationen vorgenommen sind.

Die Kurve des zerkochten Muskels zeigt die allerstärkste Abweichung. Das Zerkochen konnte natürlich nicht im Versuchsröhrchen stattfinden, so daß wir uns wieder mit dem schon in der vorigen Arbeit verwandten Kunstgriff helfen mußten. Beim Ausziehen des Glasrohres, aus dessen einer Seite das Versuchsröhrchen geformt wurde, wurde die andere Seite aufgehoben. Aus dieser wurde nun das unten geschlossene und in seiner Form so weit wie möglich dem Versuchsröhrchen ähnliche Zerkochröhrchen hergestellt, in dieses der Gastrocnemius des anderen Beines desselben Frosches hineingetan, oben zugeschmolzen und dann in eine bei etwa 115° siedende Chlorcalciumlösung für längere Zeit eingesenkt. Dann wurde der Boden in Eis gestellt und durch Erhitzen mit einer Flamme das im oberen Teile kondensierte Wasser nach unten hin abdestilliert. Das aufgesprengte Röhrchen wurde zum Versuche verwendet.

Je kürzer nun das horizontale Stück einer Kurve ist, desto geringer ist der spätere Abfall in dem stark geneigten Teile. Man kann sich das nur so erklären, daß die Wassermenge, die im horizontalen Teile nicht gefriert, dann später bei stärkerem Abkühlen auskrystallisiert. Was diesen Eindruck noch weiter verstärkt: Je stärker die Schädigung ist, desto mehr nimmt die Menge des gebundenen Wassers zu, desto geringer wird die Wärmemenge, die der Muskel während seiner Abkühlung abgibt. Daß jede neue Einwirkung den Effekt steigert, darf nicht überraschen, wenn man in Betracht zieht, daß selbst der völlig zerkochte Muskel noch sehr weit von dem energieärmsten Endzustande des Systemes, der an der Luft durch Kohlensäure, Stickstoff und salzhaltige Wasser repräsentiert wird, außerordentlich weit entfernt ist.

Tabelle I.
0,7 % NaCl. Lösung.

t	ϑ	t	ϑ	
4h 44,5	572	45	561	Bad —78°
45,5	549	46	536	
46,5	523	47	510	
47,5	500,5	48	496,8	0 = 500,5
48,5	497,2	49	497,3	
49,5	497,5	50	497,5	
50,5	497,5	51	497,5	
51,5	497,4	52	497,4	
52,5	497,4	53	497,4	0 = 500,5
53,5	497,1	54	497,1	Bad — 78°
54,5	497,0	55	496,8	
55,5	496,5	56	495,8	
56,5	494,5	57	492,3	
57,5	488,5	58	482,0	
58,5	472	59	458,5	
59,5	436	60	409	
0,5	386	1	365	
1,5	344	2	326	
2,5	310	3	296	
3,5	282	4	269	
4,5	257	5	247	Bad — 78°

Tabelle II.
Muskelbündel (Gracilis usw.) frisch.

t	ϑ	t	ϑ	
6h 55	513	6h 56	495,3	0 = 500
57	496,7	57,5	496,7	Bad = —78
58	496,7	58,5	496,7	
59	496,7	59,5	496,6	
7h 00	496,6	0,5	496,4	
1	496,2	1,5	496,0	0 = 500
2	495,9	2,5	495,8	
3	495,5	3,5	495,1	
4	494,2	4,5	492	
5	488,0	5,5	477	
6	455,0	6,5	431	
7	408,0	7,5	387	
8	367	8,5	350	
9,5	318	10,5	289	Bad = — 77,3
11,5	265	12,5	241	

Tabelle III.
Der Muskel von Tabelle II gefriert zum zweiten Male.

t	ϑ	t	ϑ	
0	560,5	0,5	548	Bad —78°
1	534,0	1,5	521,5	
2	508,0	2,5	497,0	
3	492,8	3,5	493,5	0 = 500,5
4	493,8	4,5	493,8	
5	493,8	5,5	493,9	0 = 500,6
6	494,0	6,5	494,0	
7	493,8	7,5	493,7	
8	493,5	8,5	493,2	
9	493,0	9,5	491,5	Bad —78,5°
10	489,8	10,5	486,0	
11	481,0	11,5	473,5	
12	462,5	12,5	446,0	
13	424,5	13,5	407	
14	389	14,5	371,5	
15	353	15,5	336,5	
16	322	16,5	308	
17	294	17,5	282	
18	269	18,5	257	
19	246	19,5	235,5	
20	225	20,5	—	
21	206	21,5	197	Bad —78°

Tabelle IV.
Der Muskel von Tabelle II u. III gefriert zum dritten Male.

t	ϑ	t	ϑ	
11ʰ 20	574	20,5	560	
21	553	21,5	542	
22	533	22,5	517	
23	506	23,5	495	
24	492	24,5	492,8	0 = 500
25	493,0	25,5	493,2	
26	493,2	26,5	493,2	
27	493,2	27,5	493,2	
28	493,2	28,5	493,2	Bad —78°
29	493,1	29,5	493,0	
30	492,8	30,5	492,0	
31	490,8	31,5	488,5	
32	484,5	32,5	478,5	
33	468	33,5	453	
34	433	34,5	413	

Tabelle IV. (Fortsetzung.)

t	ϑ	t	ϑ	
35	393	35,5	376	
36	358	36,5	340	
37	324	37,5	309	
38	297	38,5	283	
39	271	39,5	258	Bad —78°
40	247	40,5		

Tabelle V.

Der dreimal gefr. Muskel auf 100° gebracht.

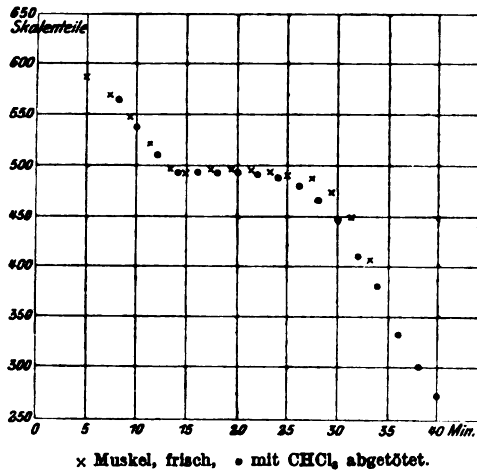
t	ϑ	t	ϑ	
0	544	0,5	531	
1	517	1,5	503	Bad —78°
2	494	2,5	492	
3	492,8	3,5	493,1	
4	493,1	4,5	493,3	
5	493,5	5,5	493,6	
6	493,7	6,5	493,5	
7	493,4	7,5	493,0	
8	491,2	8,5	488,0	
9	483,5	9,5	476	
10	468	10,5	458	
11	446	11,5	430	
12	414	12,5	395	
13	378	13,5	360	
14	342	14,5	326	
15	312	15,5	299	
16	286	16,5	274	
17	262	17,5	251	
18	240			

Tabelle VI.

Gracil. usw. des anderen Beins; zerkocht in geschlossenem Rohr bei +115°.

t	ϑ	t	ϑ	
7h 38,5	554	39,5	526	Bad—79°
40	511	40,5	497	
41	483	41,5	495,5	Unterkühlg. unt. 480,
42	495,6	42,5	495,6	
43	495,5	43,5	495,0	
44	494,8	44,5	494,2	
45	493,0	45,5	491	
46	488,0	47	476	
48	457	49	434	
50	409	51	378	
52	345	53	312	0 = 500,5
54	285	55	259	Bad = —77,1°

Diese Vermehrung der Menge des gebundenen Wassers scheint in allen Fällen einzutreten, in denen der Muskel abstirbt. Bringt man einen Muskel in eine Atmosphäre von Chloroformdampf, so beginnt er sich zusammenzuziehen, er erscheint in Licht nicht mehr opak, sondern von innen her opalartig erhellt, als ob etwas in ihm ausfiele. Er preßt ebenfalls Wasser aus. Einen solchen Muskel im Vergleiche mit einem frischen desselben Tieres zeigt Blatt IV. Wieder lauft die Kurve des durch Chloroformdampf abgetöteten Muskels erheblich unter der des frischen.



× Muskel, frisch, • mit $CHCl_3$ abgetötet.

Fig. 4.

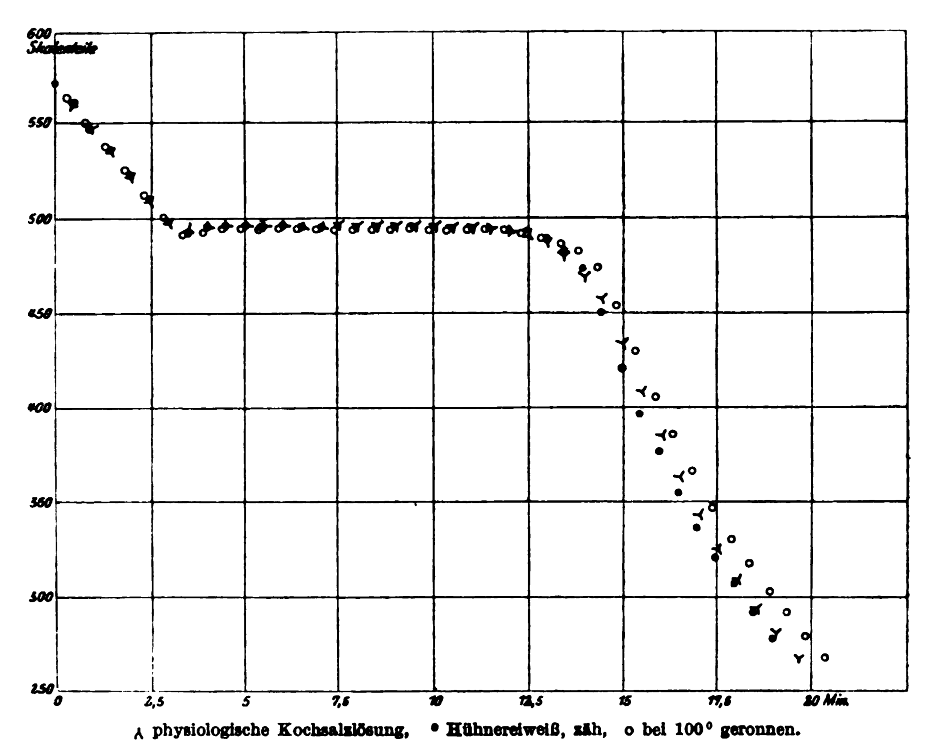
Muskel frisch.

t	ϑ	Bemerk.
0	589	
1	571	Bad — 74°
2	549	
3	522	
4	497	
5	496,3	
6	496,2	
7	495,8	
8	495,3	
9	494,5	
10	492	
11	486	
12	473	
13	448	
14	406	

Chloroform abgetötet.

t	ϑ	Bemerk.
0	565	0 = 500,0
1	538	Bad — 73°
2	510,5	
3	493,5	
4	494,7	
5	494,5	
6	493,8	
7	442,1	
8	488	
9	480	
10	467	
11	447	
12	410	
13	371	
14	333	

Diese Trübung des Muskels durch das Chloroform drängt einem in Verbindung mit der Tatsache, daß aus dem ausgepreßten Safte beim Erwärmen auf 100° zweifellos eine erhebliche Menge Eiweiß ausfällt, die Vorstellung auf, daß sich bei der Ausfällung ein Gel bildet, daß in seinen feinsten Hohlräumen das Wasser einschließt, oder es durch Verhinderung der



λ physiologische Kochsalzlösung, • Hühnereiweiß, zäh, o bei 100° geronnen.

Fig. 5.

Impfung vorläufig vor dem Gefrieren schützt. Dem widerspricht aber wieder die Kurve des zerkochten Muskels und die Erfahrung, daß im allgemeinen durch Erwärmen das Adsorptionsvermögen von Gelen verkleinert wird.

Außerdem ist keineswegs bei jeder Ausfällung physiologischer Kolloide ähnliches der Fall, wie die von uns an frischem und durch Wärme koaguliertem Hühnereiweiß aufgenommenen Kurven zeigen; danach wäre in diesem Falle die Kurve des

geronnenen Eiweißes die energiereichste, noch energiereicher wie die der physiologischen Kochsalzlösung.

Nun steht uns ja hier kein weiteres Versuchsmaterial zu Gebote. Für die Verläßlichkeit spricht aber gerade das bei diesen Kurven ausgezeichnete Ineinanderfallen der Werte. Ich würde die Abweichung der Kurve des koagulierten Eiweißes durch eine Wärmeproduktion erklären, wie sie auch bei Gelatine auftritt. Dafür spricht auch das Verhalten des Eiweißstückchens nach dem Auftauen. Wie aus einem Schwamme oder aus einem gefrorenen Gelatinepfropfen läuft aus ihm das Wasser heraus.

Tabellen zu Blatt V.

I.

Hühner-Eiweiß, zäh.

t	ϑ	t	ϑ	
5^h 41	574	41,5	561	Bad — 78°
42	549	42,5	537	
43	525	43,5	512	
44	500	44,5	494,2	
45	496,2	45,5	496,8	
46	496,8	46,5	496,8	0 = 500,0
47	496,8	47,5	496,8	
48	496,8	48,5	496,8	
49	496,8	49,5	496,8	
50	496,8	50,5	496,8	
51	496,5	51,5	496,4	
52	496,4	52,5	496,0	
53	495,5	53,5	495,4	
54	491,5	54,5	485,0	
55	475	55,5	452	
56	422	56,5	398	
57	378	57,5	357	
58	338	58,5	322	Bad — 78°
59	308	59,5	294	
60	280	6^h 0,5	268	
1	256	1,5	245	
2		2,5		

Hühner-Eiweiß von zuvor, aber bei ca. 100° geronnen. Weiß.

t	ϑ	t	ϑ	
6ʰ 41	577	41,5	565	Bad — 78°
42	552	42,5	539	
43	527	43,5	514	
44	502	44,5	492	0 = 500,0
45	494	45,5	496,0	
46	496,6	46,5	496,0	
47	496,0	47,5	495,8	
48	495,5	48,5	495,5	
49	495,4	49,5	496,0	
50	496,2	50,5	496,6	
51	496,2	51,5	496,0	
52	495,8	52,5	495,2	
53	494,8	53,5	493,8	
54	492	54,5	489,0	Bad — 78°
55	485	55,5	476	
56	456	56,5	431	
57	407	57,5	388	
58	368	58,5	349	
59	332	59,5	319	
60	305	7ʰ 0,5	293	
7ʰ 1	280	1,5	268	
2	256	2,5	246	

Von einer Erklärung der Bindung des Wassers im Muskel sind wir zurzeit noch weit entfernt, besonders weil uns noch Parallelerfahrungen fehlen. Ähnlich mögen vielleicht die Verhältnisse beim Hämoglobin liegen. Das gebundene Wasser verhält sich jedenfalls so, als ob es sich, um mit Overton zu reden, in einer anderen Phase befände wie der größere freie Teil.

Will man nun auf Grund der S. 145 gegebenen Überlegungen den Gehalt an freiem Wasser und an gebundenem ermitteln, so stellt sich dem wieder die Schwierigkeit entgegen, daß wir ebensowenig einen scharfen Endpunkt angeben können, wie wir vorhin einen Anfangspunkt des Gefrierens finden konnten. Während nun aber dem Punkte des Beginnes des Gefrierens theoretisch wenigstens eine Existenz zukommt, so kann man aber von einem Punkte, bei dem das Gefrieren gänzlich zu Ende ist, nach der ganzen Lage der Verhältnisse überhaupt nicht reden. Man kann allerhöchstens bei solchen Kurven, die von der physiologischen

Kochsalzlösung nicht gar zu sehr abweichen. mit einem verbiegbaren Kurvenlineal aus dem unteren Teile der Kurve einen Schnittpunkt mit der Temperatur des Gefrierens interpolieren.

Die Bedeutung der Interpolation ist aber folgende: Es wird unter der Annahme, daß die ganze Menge der Substanz bei derselben Temperatur ausfriert, deren Schmelzwärme ermittelt, was besagen will, daß man das Verfahren eben nur dann anwenden kann, wenn die Annahme zur Not erfüllt ist.

Da nun das Gewicht von 1 ccm Hühnereiweiß ungefähr 1,05 g ist und von diesen 1,05 g etwa 0,12 g Eiweiß sind, so befinden sich im Kubikzentimeter noch etwa 0,93 g Wasser, d. h. die Kurve müßte um 7 °/₀ kürzer sein wie die von Wasser. Nach der Zeichnung ist sie aber ungefähr um 5 °/₀ kürzer, eine für die schlechte Interpolation recht befriedigende Übereinstimmung. Nimmt man noch hinzu, daß im stark abfallenden Teile die Neigung der Eiweißkurve stärker wie die der physiologischen Kochsalzlösung ist, so kommt man zu der Überzeugung, daß ungeronnenes Hühnereiweiß sicher keine erheblichen Mengen Wasser gebunden enthält. Beim geronnenen Eiweiß kann man diese Rechnung nicht durchführen, da es ja durch Altern Wärme zu entwickeln scheint.

Führt man eine ähnliche Rechnung für den frischen Muskel durch, dessen spezifisches Gewicht 1,07 und dessen Eiweißgehalt etwa 20 °/₀ als Durchschnittszahl betragen mag (Handbuch der Physiol. von Nagel), so erhalte ich noch etwa 0,86 g Wasser pro Kubikzentimeter, also wäre eine Verkürzung von etwa 14 °/₀ zu erwarten. Aus der Kurve findet man experimentell gleichfalls 14 °/₀. Diese nahe Übereinstimmung ist aber wohl bloß zufällig, weil man aus der geringeren Neigung der Kurve des frischen Muskels in Analogie mit den übrigen Kurven immerhin noch auf etwas gebundenes Wasser schließen muß. Dessen Menge kann aber, wie aus der nahen Übereinstimmung mit der Rechnung und aus der nur geringen Neigungsdifferenz folgt, keineswegs sehr groß sein.

Hier liegt nun natürlich der Gedanke nahe, daß eben diese geringe gebundene Menge Wasser die physiologisch wichtige ist. Dann müßte erst, wenn sie beim Ausfrieren dem Muskel entzogen wird, eine Schädigung eintreten.

Die bisher über dieses Thema vorliegenden Versuche will ich nur kurz besprechen, eine ausführlichere Behandlung wird Herr Prof. Jensen geben. Du Bois-Reymond[1]) senkte mit Serum angefeuchtete Gastrocnemien in einem Reagensglas in eine „gute Kältemischung" für mehrere Minuten ein und fand die nach seiner Schätzung auf — 6° abgekühlten Muskeln sowohl nach langsamem wie nach schnellem Auftauen tot.

Kühne[2]) ließ Bündel von etwa 10 Gatroncnemien „3 Stunden lang bei — 7° bis — 10°", und findet sie nach dem Auftauen bei Zimmertemperatur noch nach 6 Stunden erregbar. Hier liegt nun natürlich der Verdacht nahe, daß das Muskelbündel nicht gründlich durchgefroren ist. Das wird durch eine Arbeit von Hermann, 169, 1871) völlig bestätigt. Hermann[3]) untersucht darin das Erfrieren in seiner Abhängigkeit von der Größe der Muskelmassen, des Betrages der Temperaturerniedrigung und der Geschwindigkeit des Auftauens und Abkühlens. Das Erfrieren scheint in einem Uhrglase stattgefunden zu haben, das auf der Kältemischung schwamm. „Allmählich abgekühlte und schließlich gefrorene Muskeln bleiben nach dem Auftauen noch lange erregbar und erstarren kaum anders als gewöhnliche, während schnell abgekühlte wenige Minuten nach dem Auftauen unter enormer Verkürzung totenstarr werden. Nachdem der Muskel einmal durchgefroren war, blieb weiteres Abkühlen wirkungslos." Ebenso war, wie auch schon von Du Bois-Reymond angegeben, die Dauer der Einwirkung der Kälte und die Geschwindigkeit des Auftauens gleichgültig. Allen diesen Arbeiten haftet der Mangel an, daß die Temperatur des Muskels nicht gemessen wird.

Wir waren nun im Gegensatz zu unseren Vorgängern in der glücklichen Lage, nicht nur die Temperatur im Muskel messen zu können, sondern waren durch Messung der Zeit auch über die Mengen des ausgefrorenen Wassers unterrichtet. Die Resultate sind aus den beigefügten Protokollbuchnotizen ersichtlich.

---

[1]) Du Bois-Reymond, Untersuchungen über tierische Elektrizität, Bd. II, 1, S. 181, Berlin 1849.

[2]) W. Kühne, Untersuchungen über das Protoplasma u. d. Kontraktilität, Leipzig 1864.

[3]) L. Hermann, Die Erstarrung infolge starker Kältegrade. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 4, 5, 189, 1871.

Als Maß der Lebendigkeit benutzten wir die Hubhöhe des Muskels. Nun zeigt sich, daß eine Abkühlung, bis gerade Gefrieren eintritt, nichts schadet, ebensowenig ein teilweises Ausfrieren des Wassers (Notizen 1, 2 und 3).

1.

Gastrocnemius.

Abkühlung bis zum Beginn des Gefrierens. Hubhöhe: 13 mm.

t	ϑ	t	ϑ	
10h 20	550	10h 20,5	534	Bad — 64°
21	519	21,5	503	
22	491	22,5*	495	* herausgenomm.
23	497	23,5	504	
24	515	24,5	—	Aussehen unv.

Hubhöhe 13,8 mm.

2.

Derselbe Muskel wird 2 Minuten über den Beginn des Gefrierens hinaus abgekühlt.

t	ϑ	t	ϑ	
10h 45	553	10h 45,5	527	
46	503	46,5	—	Bad — 63°
47	494	47,5	492	492 Maximum d. Unterkühlung.
48	491	48,5	490	Aussehen unverändert.

Hubhöhe 12 mm.

3.

Der Muskel wird 3 Minuten über den Beginn des Gefrierens hinaus abgekühlt.

t	ϑ	t	ϑ	
11h 24	565	11h 24,5	543	Bad — 61°
25	525	25,5	505	
26	496	26,5	496	494 Maximum d. Unterk.
27	495	27,5	493	
28	491	28,5	490	

Hubhöhe 9 mm.

Bringt man dagegen den Muskel in den stark abfallenden Teil der Abkühlungskurven, so ist er, wie Protokoll 4 und 5 zeigt, tot.

4.

Der Muskel von Notiz 1, 2, 3 wird jetzt bis in den stark fallenden Teil der Gefrierkurve abgekühlt.

t	ϑ	t	ϑ	
11^h 56	554	11^h56,5	530	Bad — 56°
57	507	57,5	490	0 = 500,5
57³/₄	487	58,5	490	
58¹/₄	488	58,5	487	
59	485	59,5	484	
60	482	60,5	480	
61	478	01,5	475	
2	470	2,5	465	
3	459	3,5	451	

Bei einem Rollenabstand von 66 mm unerregbar.

5.

Der Gastrocnemius des anderen Beines etwas weniger weit als der vorige abgekühlt. Anfangshubhöhe 14 mm.

t	ϑ	t	ϑ	
12^h 43	537	11^h43,5	515	Bad — 54°
44	498	44,5	475	0 = 50,1
45	494	45,5	493	
46	492	46,5	490	
47	488	47,5	487	
48	485	48,5	482	
49	479	49,5	475	Der Muskel ist unerregbar.
50	468			

Den Punkt, an dem die Schädigung eintritt, haben wir genauer festgelegt (Notizen 6, 7 und 8); z. B. zeigt der Auszug 6, daß der Muskel nach Abkühlung auf 495 zwar noch lebt, aber seine Hubhöhe nicht mehr groß ist; tödlich wirkt die Abkühlung auf 485 selbst auf einen frischen Muskel (8). Es kann zwar gelingen, daß man ihn noch lebend in den Reizapparat bringt (8), doch nach wenigen Sekunden zeigt er sich auch bei übermaximalen Reizen nicht mehr erregbar. Also zwischen Leben und Tod liegen nur ca. 10 Skalenteile, entsprechend 1,5°.

6.

Abkühlung bis gegen Ende des Ausfrierens von freiem Wasser. Besonders großer Gastrocnemius Escul., frisch; Hubhöhe 14,5 mm.

t	ϑ	t	ϑ	
5h 15	620	5h 22,5	529	Bad — 33°
23	521	23,5	512	
24	504	24,5	498	0 = 501,5
25	497	25,5	498	
26	498	26,5	498	
34	497	34,5	497	
35	496	35,5	495	

Hubhöhe 7 mm.

7.

Derselbe Gastrocnemius abgekühlt bis zum ersten Anfang des Ausfrierens von gebundenem Wasser.

t	ϑ	t	ϑ	
6h 24	650	6h 31	580	Bad — 33°
33	540	34	510	
34,5	501	35	497,5	0 = 502
35,5	498,8	36	498,8	
36,5	498,8	37	498,9	
38	499,0	38,5	499,0	
39	498,7	39,5	498,8	
43,5	498,0	44	497,8	
45	497,0	46	496,5	
47	495,0	48	4930,	
49	495,5	50	486,5	Muskel glasig.

Bei einem Rollenabstand von 30 mm unerregbar.

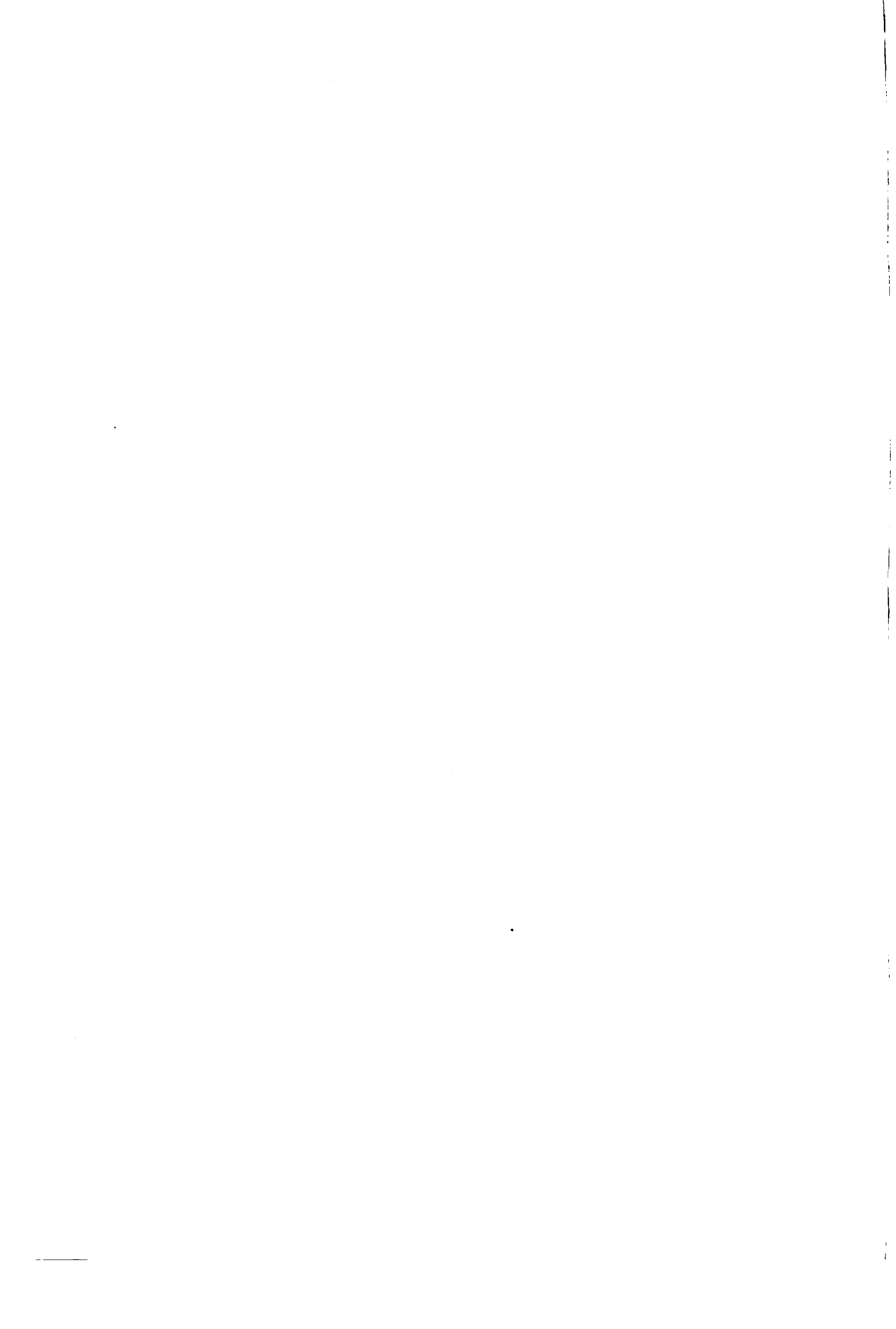
8.

Der andere Gastrocnemius desselben Tieres. Hubhöhe 35.

t	ϑ	t	ϑ	
7h 34	630	7h 38,5	541	Bad — 29,5°
39,5	523	40,5	507	0 = 502
41,5	499,0	42,5	499,2	
49,5	498,0	50,5	497,5	
51,5	496,8	52,5	495,8	
53,5	493,8	54,5	493,0	
55,5	491,0	56,5	489,0	
57,5	485,8			

Bei Rt. 30 noch 8 mm Hubhöhe, dann bei Rt. 60 nur 4 mm, bei nochmaliger Wiederholung 0.

Der Tod wird also wahrscheinlich durch einen Vorgang herbeigeführt, der durch die Entziehung des physiologisch gebundenen Wassers verursacht wird. Er braucht nicht momentan einzutreten, daher bleibt es fraglich, ob nicht unter geeigneten Umständen, d. h. wenn sich der Muskel im ganzen Tiere befände und z. B. mit sauerstoffhaltigem Blute durchspült würde, er sich nicht vielleicht wieder erholen kann. Das scheint nach Versuchen von Heubel (Pflügers Archiv 45, 564ff., 1885) keineswegs ausgeschlossen.



Über die Giftigkeit einiger Farbstoffe für die Eier von Asterias und von Fundulus.

Von

Elizabeth Cooke und Leo Loeb.

(Aus dem Marine Biological Laboratory, Woods Holl, Mass., und dem Laboratorium für experimentelle Pathologie der University of Pennsylvania, Philadelphia.)

(Eingegangen am 29. Juni 1909.)

Im Anschluß an frühere Beobachtungen über den Einfluß des Lichtes auf die Färbung und Entwicklung von Seesterneiern in Lösungen einiger, insbesondere fluorescierender Farbstoffe[1]) soll über weitere, während des Sommers 1907 und 1908 ausgeführte Untersuchungen berichtet werden, in denen das Verhalten gewisser Farbstoffe gegenüber den Seesterneiern und den Eiern eines marinen Fisches, Fundulus, verglichen wurde.

Die Versuche wurden meist in der Weise ausgeführt, daß die befruchteten oder unbefruchteten Eier in Glasschalen, die je 50 ccm der betreffenden Farbstofflösungen enthielten, eingeführt wurden. Diese Schalen wurden mit Glasscheiben bedeckt und dem diffusen Tageslicht ausgesetzt oder im Dunkeln gehalten. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Farbstofflösungen benutzt; in den meisten Fällen wurden jedoch ein Teil Eosin in 5000 Teilen, ein Teil Methylenblau, Thionin oder Bismarckbraun in je 10000 Teilen und ein Teil Neutralrot in je 50000 Teilen Seewasser resp. destillierten Wassers oder $^5/_8$-n-NaCl-Lösung gelöst. In vielen Fällen wurden gleichzeitig eine Anzahl weiterer Verdünnungen sowie Mischungen der verschiedenen Farbstoffe benutzt.

1. Methylenblau, Neutralrot, Thionin, Bismarckbraun sind im Lichte für Seesterneier sehr giftig. Eine weitere Abstufung der Giftigkeit dieser vier Farbstoffe ist für unsere Zwecke nicht

[1]) Leo Loeb, Über den Einfluß des Lichtes auf die Färbung und die Entwicklung von Eiern von Asterias in Lösungen verschiedener Farbstoffe. Arch. f. Entwicklungsmechanik 23, 1907.

notwendig; jedenfalls ist Neutralrot nicht giftiger als die übrigen genannten Farbstofflösungen. Eosin ist bedeutend weniger giftig. Auch im Dunkeln sind Bismarckbraun und Thionin sehr giftig für Seesterneier, sodann folgen etwa Methylenblau, Neutralrot und Eosin in einer Reihe mit abnehmender Giftigkeit.

Neutralrot und Methylenblau dringen sehr leicht in die Seesterneier ein; auch Thionin und Bismarckbraun dringen in die Eier ein; insbesondere Neutralrot und Methylenblau färben die lebenden Eier sehr schnell.

Eosin färbt nur das abgestorbene Zellprotoplasma. Doch ist es sehr wohl möglich, daß dieser Farbstoff noch während des Lebens von Seesternembryonen durch intercelluläre Spalten hindurch in den Embryo eindringt. Dafür spricht die von L. P. Shippen[1]) und mir gemachte Beobachtung, daß abgestoßene tote Zellen im Inneren einer Blastula häufig sich mit Eosin färben, obwohl diese abgestorbenen Zellen von einer Zone lebender, ungefärbter Zellen umgeben sind. In diesem Falle muß das Eosin in kleinen Mengen in das Innere der Blastula eingedrungen sein. Jedenfalls sehen wir, daß diejenigen Farbstoffe, die das Protoplasma der Seesterneier schnell färben, im Lichte für dieselben sehr giftig sind.[2])

2. Die Wirkung des Lichtes auf Eier in fluorescierenden Farbstoffen wird aufgehoben, falls der Sauerstoff der Lösung durch Wasserstoff ersetzt wird. Jedenfalls bleiben Eier in einer Wasserstoffatmosphäre in fluorescierenden Farbstofflösungen viel besser erhalten als in einer Sauerstoffatmosphäre, wenn auch die Einführung des Wasserstoffs eine gewisse Anzahl von Eiern sonstwie schädigen kann. Ganz allgemein bedürfen ja die in den Bereich des sichtbaren Spektrums fallenden Lichtstrahlen zu ihrer schädigenden Wirkung auf Zellen und Enzyme des Sauerstoffs,

Wir wissen nun, daß KCN schon in geringen Mengen gewisse Oxydationsprozesse hemmt, insbesondere die Atmungs-

---

[1]) L. P. Shippen, The effect of light on the development and staining of ova in Eosin solutions. University of Pennsylvania, Medical Bulletin 1907.

[2]) In betreff der biologischen Wirkung fluorescierender Stoffe vgl. die zusammenfassende Abhandlung von H. v. Tappeiner, Die photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung durch fluorescierende Stoffe). Ergebnisse d. Physiologie, 8. Jahrgang, 1909.

prozesse bei Tieren und Pflanzen und die Entwicklungsprozesse in den Eiern aufhebt. Es war daher von Interesse, zu untersuchen, ob KCN auch diejenigen oxydativen Vorgänge hemmt, die bei der Wirkung von fluorescierenden Substanzen auf Seesterneier im Lichte in Betracht kommen. Es wurden daher zu 50 ccm der Lösungen fluorescierender Farbstoffe (Neutralrot, Eosin, Methylenblau und Mischungen dieser Substanzen) in Seewasser jeweilen 4 ccm $^1/_{20}$ $^0/_0$ KCN zugesetzt; ein solcher Zusatz genügt, um die Eifurchung aufzuheben.[1]) Es ergab sich nun, daß in keinem Falle Zusatz von KCN zu fluorescierenden Farbstofflösungen die schädigende Wirkung der Strahlen des sichtbaren Spektrums verringerte; wohl aber verstärkte im Gegenteil KCN sehr merklich die schädigende Wirkung des Neutralrotes gegenüber Eiern, die dem Lichte ausgesetzt waren; so wurde z. B. eine Wirkung, die sonst erst nach einem 1stündigen Aufenthalt in der Neutralrotlösung eintrat, nach Zusatz von KCN bereits nach einer halben Stunde beobachtet.

Auch Mischungen von Eosin und Methylenblau scheinen in ähnlicher Weise von KCN beeinflußt zu werden; doch müssen hierüber noch weitere Versuche angestellt werden.

Nach unseren bisherigen Versuchen wird auch nach Zusatz von KCN die schädigende Wirkung des Lichtes auf Eier in fluorescierenden Lösungen durch Verdrängung des Sauerstoffs durch eine Wasserstoffatmosphäre aufgehoben.

Falls die Eier statt im Lichte im Dunkeln gehalten werden, ist die schädigende Wirkung des Zusatzes von KCN zu Neutralrot viel geringfügiger als im Lichte.

A u s   d i e s e n   V e r s u c h e n   k ö n n e n   w i r   s c h l i e ß e n ,   d a ß   d i e   b e i   d e r   s c h ä d i g e n d e n   W i r k u n g   d e s   L i c h t e s   a u f   i n   f l u o r e s c i e r e n d e n   L ö s u n g e n   b e f i n d l i c h e   E i e r   i n   B e t r a c h t   k o m m e n d e n   O x y d a t i o n s p r o z e s s e   g a n z   v e r s c h i e d e n   s i n d   v o n   d e n   b e i   d e r   A t m u n g   u n d   Z e l l t e i l u n g   s t a t t f i n d e n d e n   o x y d a t i v e n   V o r g ä n g e n   u n d   n i c h t   e t w a   n u r   e i n e   V e r s t ä r k u n g   d i e s e r   l e t z t e r e n   P r o z e s s e   d a r s t e l l e n. KCN dürfte vielleicht die bei der Lichtwirkung in Betracht kommenden Spaltungsprozesse erleichtern.

---

[1]) J a c q u e s   L o e b, Versuche über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorganges. Diese Zeitschr. 1, 1906.

3. Die Eier des marinen Fisches, Fundulus, verhalten sich denselben Farbstoffen gegenüber anders als die Eier von Asterias. Die letzteren schwellen unter der Einwirkung des Lichtes in Lösungen von Neutralrot, Methylenblau und Eosin an, Vakuolen bilden sich, das Eiprotoplasma zerfällt in Tropfen. Eine Schädigung der Eier von Fundulus äußert sich in anderer Weise; die hierbei sich abspielenden Vorgänge sind der bei Pflanzenzellen beobachteten Plasmolyse ähnlich.

Das Fundulusei ist von einer verhältnismäßig widerstandsfähigen äußeren Schale umgeben; dieser liegt nach innen zu die Dottermembran dicht an. Später sondert sich in dem Ei der eigentliche Embryo von dem Dottersack. In den späteren Entwicklungsstadien wird die Dottersackmembran durch Flüssigkeit von der äußeren Eischale getrennt. Der Dottersackmembran liegen dem Verlaufe der Blutgefäße entlang verschiedene sternförmig verzweigte Zellen (insbesondere Chromatophoren) an.

Unter der Einwirkung von Giften retrahiert sich nun die Dottermembran von der äußeren Schale; sodann nimmt der Dotter von außen Flüssigkeit auf, die Dottermembran platzt, und ein Teil des Eierinhaltes, insbesondere die im Dotter befindlichen Öltropfen treten durch den Riß in der Dottermembran nach außen unter die äußere Schale. Es scheint aber, wenn auch selten, vorzukommen, daß die Dottermembran zerreißt, ohne daß anscheinend vorher eine Loslösung von der äußeren Schale stattgefunden hat. Hiernach retrahiert sich die Dottermembran und mit ihr der Embryo; eine weitere Entwicklung des Embryos findet nicht statt. Diese Reaktion bleibt dieselbe verschiedenartigen Giften gegenüber.

Während, wie wir sahen, dem Asteriasei gegenüber alle obengenannten Farbstoffe sehr schädlich sind, sind dem Fundulusei gegenüber im Dunkeln wie im Lichte dieselben Farbstoffe (Methylenblau, Bismarckbraun, Thionin, Eosin) unschädlich. Auch Neutralrot ist im Dunkeln unschädlich, aber im Lichte ist es viel schädlicher als die anderen Farbstoffe.

Während nun die anderen Farbstoffe in allen Entwicklungsstadien ganz oder fast ganz unschädlich gegenüber dem Fundulusei sind, wechselt die Giftigkeit des Neutralrots im Lichte je nach der Entwicklungsstufe des Embryos. Wir können drei Perioden unterscheiden:

a) Eier, die im Laufe der ersten 16 Stunden nach der Befruchtung in Lösungen von Neutralrot dem Lichte ausgesetzt wurden und weiterhin in der Lösung verblieben, waren schon 2 Tage nach der Befruchtung bedeutend in der Entwicklung

zurückgeblieben im Vergleich zu den im Dunkeln in Neutralrot gehaltenen Eiern, und die Anzahl der plasmolysierten Eier war im Lichte meist beträchtlich. 3 Tage nach der Befruchtung war die große Mehrzahl (oder sogar alle Eier) im Lichte in Neutralrot plasmolysiert. In den übrigen Farbstofflösungen hingegen war die Entwicklung ähnlich wie in reinem Seewasser oder in destilliertem Wasser, die beide für die Entwicklung der Funduluseier gleich geeignet sind.

b) Eier, die etwa 19 bis 30 Stunden nach der Befruchtung in die Lösungen gebracht wurden, verhielten sich ähnlich wie in der ersten Periode, nur war der Unterschied zwischen Neutralrotwirkung im Lichte und im Dunkeln geringer als in der ersten Periode. In einigen Versuchen fanden wir lediglich Unterschiede in der Entwicklungsgeschwindigkeit der Eier, die im Dunkeln größer ist; in anderen Fällen war aber auch die Zahl der plasmolysierten Eier im Lichte größer, doch war auch in solchen Fällen der Unterschied zwischen Neutralrot, Licht und Dunkel weniger stark als in der ersten Periode.

c) Eier, die 2 bis 4 Tage nach der Befruchtung in die betreffenden Lösungen eingelegt wurden, entwickelten sich im Lichte in Neutralrot fast ebenso gut wie im Dunkeln; nur zuweilen war die Blutzirkulation nicht ganz so lebhaft, nachdem die Eier einige Tage in Neutralrot dem Lichte ausgesetzt gewesen waren.

Wir sehen also, daß je weiter sich die Funduluseier entwickeln, sie desto weniger empfindlich gegenüber der Einwirkung des Lichtes in Neutralrotlösungen werden.

4. Zusatz von KCN (in demselben Verhältnis wie in den Versuchen mit Seesterneiern) verstärkt auch hier die schädigende Wirkung des Neutralrots im Lichte; aber auch im Dunkeln schädigt Zusatz von KCN zu den verschiedenen Farbstofflösungen die Eier und hat eine Verzögerung in der Entwicklung, schlechtere Zirkulation des Blutes und häufigere Plasmolyse zur Folge.

5. Wir sehen also, daß a) Neutralrot durch seine Giftigkeit im Lichte sich merklich von den anderen Farbstoffen unterscheidet und b), daß die Giftigkeit des Neutralrots im Lichte mit der fortschreitenden Entwicklung des Embryos abnimmt.

Diesem Unterschiede in der Giftigkeit entsprechen nun Unterschiede in der Färbung der Eier durch die verschiedenen Farbstoffe.

Während die verschiedenen Farbstoffe, wie wir sahen, leicht die Asteriaseier färben, ist Neutralrot der einzige der benutzten Farbstoffe, der Zellen des eigentlichen Embryos und des Dottersackes von Fundulus färbt, ehe dieselben geschädigt sind.

Neutralrot färbt die äußere Schale von in Seewasser befindlichen Eiern leicht rosa, färbt die Dottermembranzellen (resp. ihre Granula) und eine Anzahl von Zellen in verschiedenen Teilen des eigentlichen Embryos rot. Methylenblau, welches die Asteriaseier leicht färbt, färbt nur die äußere Schale der Funduluseier. Die embryonalen Zellen von Fundulus werden durch Methylenblau gewöhnlich gar nicht gefärbt. Doch kann man zuweilen bemerken, daß Methylenblau sternförmige, den Dottersackblutgefäßen anliegende Zellen färbt, falls die Zirkulation in solchen. Gefäßen schlechter wird; Methylenblau färbt also gewöhnlich nur erkrankte Zellen im lebenden Embryo. Doch kann es auch, wenn auch nur sehr selten, vorkommen, daß Zellen sich mit Methylenblau färben, obwohl die Zirkulation in den benachbarten Gefäßen unversehrt ist. In einigen solchen Fällen setzte ich die Eier dem Lichte aus; bald färbten sich mehr und mehr Zellen blau, und nun starben die Embryonen im Verlauf von mehreren Stunden ab. Sobald also das Methylenblau die Zellen von Fundulusembryonen gefärbt hat, wird auch dieser Farbstoff für die Eier im Lichte giftig.

Thionin, Bismarckbraun und Eosin färben den eigentlichen Embryo nicht, sondern nur die äußere Schale.

Falls hingegen Plasmolyse des Eies stattgefunden hat, färben Methylenblau und Thionin auch den Embryo; diese Farbstoffe, ebenso wie Eosin, färben auch die unter die äußere Schale durch die Dottersackmembran durchgetretene Flüssigkeit in plasmolysierten Eiern. Die Embryonen plasmolysierter Eier nehmen allmählich mit Neutralrot eine schmutzig rotbraune Färbung an oder sie werden ganz entfärbt. Die nach stattgefundener Ruptur der Dottersackmembran unter die äußere Schale ausgetretenen Öltropfen färben sich nach mehreren Tagen

häufig mit Neutralrot gelbbraun oder rötlichbraun, mit Methylenblau blaugrünlich, während die in dem normalen Dottersack befindlichen Öltropfen sich mit Neutralrot oder Methylenblau nicht färben.

Mit fortschreitender Entwicklung des Embryos verlieren allmählich die mit Neutralrot gefärbten Zellen ihre Färbung; die Zahl der mit Neutralrot gefärbten, im Dottersack und im eigentlichen Embryo gelegenen Zellen wird schon am dritten und vierten Tage nach der Befruchtung geringer und am fünften Tage nach der Befruchtung ist im wesentlichen nur mehr die Leber gelbrot gefärbt. Die gleichzeitig befruchteten, in derselben Glasschale befindlichen Eier verhalten sich hierbei nicht immer ganz gleich, indem die weiter entwickelten Embryonen weniger Färbung als die in der Entwicklung ein wenig zurückgebliebenen Eier zeigen können. Eier, die erst 4 Tage nach der Befruchtung in die Neutralrotlösung gebracht worden waren, zeigten am folgenden Tage lediglich eine Färbung der Leber.

6. Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß eine Parallelität zwischen dem Grade der Giftigkeit der Farbstoffe und ihrem Vermögen, in die Zellen des Embryos und Dottersacks einzudringen, besteht. Das den Embryo färbende Neutralrot ist im Lichte giftig, während die anderen nicht färbenden Stoffe ungiftig sind. Ferner verliert Neutralrot allmählich mit fortschreitender Entwicklung des Embryos an Giftigkeit; in entsprechender Weise verliert allmählich Neutralrot die Fähigkeit, den Embryo (mit Ausnahme der Leber) zu färben. Die Färbbarkeit nimmt also zu einer Zeit ab, wo der Embryo schon weiter entwickelt ist; die Abnahme der Giftigkeit ist schon auf früheren Entwicklungsstadien bemerkbar; hierbei ist aber zu berücksichtigen, daß die giftige Wirkung des Neutralrots im Lichte gewöhnlich erst zur vollen Geltung kommt, nachdem die Eier 2 bis 3 Tage lang in der Lösung gelegen hatten.

Ob nun der Mangel an Färbung der Zellen lediglich auf dem mangelnden Vermögen der betreffenden Farbstoffe, die Dottermembran zu durchdringen, beruht, ist zweifelhaft. Die äußere Schale bietet jedenfalls, wie wir sahen, den Farbstoffen keinen Widerstand dar. Aber wahrscheinlich können Farbstoffe, wenigstens in beschränktem Maße, auch die Dottermembran durchdringen, ohne deshalb die embryonalen Zellen färben zu

müssen; so färbt ja Neutralrot noch die Leber zu einer Zeit, wo andere Zellen nur in geringer Zahl oder gar nicht mehr gefärbt wurden. In entsprechender Weise sahen wir, daß Methylenblau imstande ist, gewisse verzweigte Zellen den Gefäßen entlang zu färben, falls die Zirkulation in den benachbarten Gefäßen mangelhaft wird. Auch hier muß Methylenblau schon vorher durch die Dottermembran gedrungen sein, ohne deshalb die gesunden Zellen gefärbt zu haben.

Auch Eosin kann in die Perikardialhöhle dringen und daselbst abgestoßene, tote Zellen färben, während die gesunden Zellen des Embryos ungefärbt bleiben, eine Beobachtung, die der oben erwähnten entspricht, derzufolge Eosin desquamierte Zellen in der zentralen Höhle von Echinodermenblastulae färbt.

Also neben der Permeabilität der inneren Eimembran kommt wahrscheinlich noch eine Permeabilität und Färbbarkeit der individuellen Zellen des Embryos in Betracht. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß möglicherweise auch Farbstoffe, nachdem sie Zellen gefärbt haben, in solchen Zellen wieder zerstört oder aus den Zellen eliminiert werden können; eine solche Annahme wird durch den Umstand nahegelegt, daß die Zahl der mit Neutralrot gefärbten Zellen allmählich abnimmt.

Jedenfalls aber können wir aus den mitgeteilten Versuchen schließen, daß Farbstoffe auf Fundulusembryonen im Lichte nur dann stark giftig wirken, falls sie in die Zellen des Embryos eindringen.

7. Mit fortschreitender Entwicklung werden also die Fundulusembryonen allmählich weniger empfindlich gegen die Wirkung des Neutralrots unter dem Einflusse des Lichtes. Eine ganz parallele Abnahme findet sich nun in der Giftigkeit von NaCl-Lösungen gegenüber Fundulusembryonen. Jacques Loeb[1]) hatte festgestellt, daß Fundulusembryonen sich in Seewasser und in destilliertem Wasser gleich gut entwickeln, daß aber eine mit Seewasser isotonische NaCl-Lösung für dieselben giftig ist. Er beobachtete auch, daß ältere Embryonen resistenter gegenüber der Wirkung des NaCl sind, als frühere Entwick-

[1]) Jacques Loeb, The Poisonous character of a pure NaCl solution. Amer. Journ. Physiol. 3, 327, 1900. — Derselbe, The toxic and antitoxic effects of Ions as a Function of their valency and possibly their electrical charge. Amer. Journ. Physiol. 6, 411, 1902.

lungsstadien. Bringt man im Laufe der ersten 19 Stunden nach der Befruchtung Funduluseier in $^5/_8$ n-NaCl-Lösungen, so findet Plasmolyse der Eier statt. Eier, die 29 Stunden nach der Befruchtung oder später in mit Seewasser isotonische NaCl-Lösung gebracht werden, entwickeln sich fast ebenso gut wie in Seewasser; doch ist die Entwicklung ein wenig langsamer.

Ungefähr in der gleichen Periode fängt das Licht an, weniger schädlich auf die in Neutralrotlösungen befindlichen Eier einzuwirken. Zusatz von KCN beeinflußt die in NaCl befindlichen Eier in ähnlicher Weise, wie die in mit Seewasser hergestellten Farbstofflösungen liegenden Eier; KCN hemmt die Entwicklung und beeinflußt die Zirkulation ungünstig.

In der mittleren Periode (19 bis 29 Stunden nach der Befruchtung) ist NaCl sehr giftig für die Funduluseier. Hier beobachteten wir aber in mehreren Versuchen, daß Zusatz von Eosin (und in einem Versuch auch Methylenblau und in geringem Grade sogar Neutralrot) einen gegen die NaCl-Wirkung schützenden Einfluß auf die Eier ausübten. In einer $^5/_8$ n-NaCl-Lösung, die Eosin (1 Teil auf 5000 Teile NaCl-Lösung) enthielt, entwickelten sich die Eier viel besser als in einer reinen NaCl-Lösung. Ob diese schützende Wirkung dem Eosin als solchem zukommt oder anorganischen Beimengungen, ist nicht sicher; die letztere Annahme ist aber vorläufig wahrscheinlicher, da mehrwertige Kationen in geringen Mengen gegenüber NaCl entgiftend wirken.[1])

Daß zu dieser Zeit Eosinlösungen günstig auf die Eier einwirken, weist darauf hin, daß etwa 19 bis 29 Stunden nach der Befruchtung die Giftigkeit der NaCl-Lösungen für Funduluseier bereits eine gewisse Abnahme zeigt.

8. Wir sehen also, daß ein gewisser Parallelismus in den Toxizitätskurven des NaCl und des Neutralrots im Lichte für Fundulusembryonen in verschiedenen Entwicklungstadien besteht. Wie wir oben zeigten, besteht wiederum eine Beziehung zwischen der Fähigkeit des Neutralrots, in die Zellen ein-

---

[1]) Vgl. Jacques Loeb, The toxic and antitoxic effects of Ions etc., l. c. Es fanden sich gemäß einer Analyse, die Herr Dr. van Slyke auszuführen die Güte hatte, in dem Eosinpräparat (Grübler, Marke: blau, wasserlöslich) als Beimengungen 0,14 % Fe und 0,20 % Mg.

zudringen und seiner Giftigkeit im Lichte. Es wäre nun die einfachste Annahme, daß auch die Giftigkeit des NaCl ähnlich wie die des Neutralrots im Lichte von seinem Eindringen in die Zellen abhängt, und daß in gleicher Weise mit fortschreitender Entwicklung des Embryos Neutralrot im Lichte und NaCl deshalb weniger giftig werden, weil die Dottermembran oder die Zellen des Embryos mit fortschreitender Entwicklung für beide Stoffe in gleicher Weise weniger durchgängig würden.

Daraus würde nun folgen, daß die Permeabilität der Dottermembran und gewisser Zellen von Funduluseiern für das lipoidlösliche Neutralrot ähnlichen Bedingungen unterliegt wie für das lipoidunlösliche NaCl.

Diese Folgerung steht im Widerspruch zu den Anschauungen von Overton und Hoeber, die unter gewöhnlichen Bedingungen nur eine Permeabilität der Zellmembran für lipoidlösliche Substanzen annehmen, und falls eine Permeabilität von Zellen für anorganische Salze besteht, dieselbe von ganz anderen Bedingungen („physiologischen" Veränderungen der Zellen) abhängig machen.[1])

Wohl aber stützen die hier mitgeteilten Versuche die Schlußfolgerungen von Jacques Loeb[2]), Robertson[3]) und Ruhland[4]), die nachwiesen, daß keine durchgehende Parallelität zwischen der Lipoidlöslichkeit von Substanzen und ihrem Vermögen, in lebende Zellen einzudringen, besteht. So wäre es erklärlich, daß die Permeabilität der Zellen für Neutralrot und für NaCl einer ähnlichen Kurve folgt.

Zusammenfassung.

1. Die Giftigkeit einer Anzahl von Farbstoffen für Seesterneier ist verschieden von der Giftigkeit derselben Farbstoffe für Funduluseier. Auch wechselt die Giftigkeit für Fun-

---

[1]) Rudolf Höber, Physikal. Chem. d. Zelle u. d. Gewebe. Leipzig 1906.

[2]) Jacques Loeb, Über physiol. Ionenwirkungen, Handb. d. Biochemie, 8. u. 9. Lieferung 1908, S. 104.

[3]) T. B. Robertson, On the nature of the superficial layer in cells and its relation to their permeability and to the staining of tissues by dyes. Journ. of Biolog. Chem. 4, 1908.

[4]) W. Ruhland, Beiträge zur Kenntnis d. Permeabilität d. Plasmahaut. Jahrb. f. wiss. Botanik 46, 1908.

duluseier in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die Giftigkeit geht parallel dem Färbevermögen dieser Farbstoffe für die Seestern- und Funduluseier und für die verschiedenen Entwicklungsstadien der Funduluseier. Die Giftigkeit der Farbstoffe hängt daher im wesentlichen von der Permeabilität der verschiedenen Eier für die betreffenden Farbstoffe ab. Diese Permeabilität ist verschieden in verschiedenen Eiern und in verschiedenen Entwicklungsstadien desselben Eies.

2. Die Giftigkeit von Neutralrot im Lichte und von Natriumchlorid nimmt in ähnlicher Weise mit zunehmender Entwicklung von Fundulusembryonen ab. Diese Parallelität weist darauf hin, daß eine wesentliche Bedingung für die Giftigkeit von Neutralrot und von NaCl gleich ist. Diese Bedingung dürfte in der wechselnden Permeabilität der Eier in verschiedenen Entwicklungsstufen für das lipoidlösliche Neutralrot und lipoidunlösliche anorganische Salze beruhen. Hieraus folgt, daß die Lipoidlöslichkeit einer Substanz nicht der wesentliche, die Aufnahme von Substanzen in das Zellinnere bestimmende Faktor sein kann.

3. Zusatz von KCN, das gewisse Oxydationsprozesse hemmt, zu Lösungen gewisser fluorescierender Substanzen verstärkt die Giftwirkung derselben merklich.

Wir können daraus schließen, daß die bei der biologischen Wirkung fluorescierender Substanzen in Betracht kommenden Oxydationsprozesse sich von den bei der Atmung und bei der Zellteilung stattfindenden oxydativen Vorgängen wesentlich unterscheiden.

Methoden zur Verschärfung von Adrenalin- und Brenzcatechinreaktionen.

Von

Gustav Bayer.

(Aus dem Institute für allgemeine und experimentelle Pathologie der k. k. Universität Innsbruck.)

(Eingegangen am 12. Juli 1909.)

I. Verschärfung der Eisenchloridreaktion auf Adrenalin und Brenzcatechin durch Sulfanilsäure.

Da Diazokörper bekanntlich mit Mono-, Di- und Polyphenolen Azofarbstoffe bilden, versuchte ich, ob sich auf diese Weise Adrenalin nachweisen lasse, ohne hierbei Erfolge zu erzielen, was übrigens nach der Griesschen Regel[1]), derzufolge von den Dioxybenzolen nur die Derivate der Metareihe unter Bildung von Azokörpern reagieren, zu erwarten war. Die Versuche waren so vorgenommen worden, daß zu den Adrenalinlösungen eine gesättigte wässerige Lösung von p-Amidobenzolsulfonsäure und Natriumnitrit hinzugefügt wurde.

Als ich einmal mit einem solchen farblos gebliebenen Gemisch von Adrenalin und diazotierter Sulfanilsäure die Vulpiansche Eisenchloridreaktion anstellte, trat statt der charakteristischen Grünfärbung eine unerwartet intensive und dunkelrotbraune Färbung ein. In weiterer Verfolgung dieser Erscheinung zeigte sich dann, daß weder das Natriumnitrit noch die Diazokörper, sondern der Zusatz der Sulfanilsäure allein, die an sich keine Farbenreaktion mit Eisenchlorid gibt, für den abweichenden Verlauf der Reaktion verantwortlich gemacht werden müsse.

---

[1]) Zit. nach H. Meyer, Analyse und Konstitutionsermittelung organischer Verbindungen, 1903, S. 313.

Ein Vergleich der Empfindlichkeit der Eisenreaktion auf Adrenalin mit und ohne Sulfanilsäure zeigte dann, wie aus Tabelle I hervorgeht, die höhere Empfindlichkeit der mit Anilinsulfonsäure angestellten Reaktion.

Tabelle I.

Reaktionen von Adrenalin mit 2 Tropfen einer 20%igen Eisenchloridlösung. Adrenalinlösung von Parke, Davis und Comp. 1:1000. Bei Angabe der Adrenalinmengen in den einzelnen Proben wurde auf den im Hinblick auf die leichte Zersetzlichkeit des Adrenalins möglichen Mindergehalt nicht Rücksicht genommen. Gesamtflüssigkeitsmenge in jedem Röhrchen 2,5 ccm.

Adrenalinmenge mg	Mit Sulfanilsäure	Ohne Sulfanilsäure
0,2	undurchsichtig rotbraun	schmutzig grüngelb
0,1	durchsichtig rotbraun	keine Grünfärbung, gelb
0,05	durchsichtig rötlichbraun	gelb
0,02	gelbbraun	„
0,01	bräunlichgelb	„
0,005	gelb (Eisenchloridfarbe)	„

Die vorstehende Tabelle zeigt demnach, daß der Zusatz von Sulfanilsäure die Vulpiansche Reaktion um mehr als das 10fache verschärft.

In gleicher Weise und in noch höherem Grade als die Adrenalinreaktion wird durch die Sulfanilsäure auch die Eisenchloridreaktion auf Brenzcatechin modifiziert. (Vgl. Tabelle II.)

Tabelle II.

Reaktion von Brenzcatechinlösungen mit 2 Tropfen 20%iger Eisenchloridlösung. Gesamtflüssigkeitsmenge in jedem Röhrchen 2,5 ccm.

Brenzcatechinmenge mg	Mit 1 ccm Sulfanilsäurelösung	Mit 1 ccm destillierten Wassers
1,0	undurchsichtig rotbraun	schwarzgrün
0,5	„ „	dunkelgrün
0,2	„ „	gelbgrün
0,1	kaum durchsichtig rotbraun	schwach grünlich gelb
0,05	durchsichtig braun	gelb
0,01	braun	„
0,005	erkennbar braun	„
0,002	gelb	„

Nach den in Tabelle II wiedergegebenen Verhältnissen darf man demnach von einer Empfindlichkeitssteigerung der Eisenchloridreaktion durch die Sulfanilsäure um das 20fache sprechen.

Als weiterer Vorteil der unter Zusatz von Sulfanilsäure ausgeführten Reaktion gegenüber der gewöhnlichen Eisenchloridreaktion muß erwähnt werden, daß die letztere durch Alkohol, Säuren sowie durch einen Überschuß der Eisenlösung zum Verschwinden gebracht wird,[1]) die mit Sulfanilsäure ausgeführte Probe hingegen diesen Einflüssen gegenüber viel beständiger ist, ferner daß die rotbraune Färbung der Sulfanilreaktion mit der Zeit intensiver wird, während die Grünfärbung der Vulpianschen Reaktion beim Stehen rasch abnimmt.

Die ebenfalls zuerst von Vulpian beobachtete rosenrote Jodreaktion, die Reduktion von salpetersaurem Silber,[2]) die Comesattische Sublimatreaktion sowie auch die biologische Reaktion auf die Froschpupille (nach Meltzer-Ehrmann) werden durch Sulfanilsäure nicht begünstigt, sondern im Gegenteil gestört. Ebensowenig erfährt die Eisenchloridreaktion auf andere Phenolderivate (Carbolsäure, Hydrochinon, Resorcin, Benzoesäure, Salicylsäure, Sulfosalicylsäure) durch die p-Amidobenzolsulfonsäure eine Förderung oder Änderung.

Nur die Reaktionen auf Guajacol und auf α-Naphthol scheinen eine gewisse Modifikation zu erfahren.

Versuche, über die chemischen Ursachen dieser Reaktionsverstärkung und -änderung Aufschlüsse zu erhalten, waren bisher erfolglos. Anilin und eine Reihe seiner Derivate, so Dimethyl-, Diäthylanilin, Sulfocarbanilid, Sulfobenzolazodimethylanilin, Acetanilid u. a. m. wurden untersucht, gaben aber kein der Anilinsulfonsäurereaktion ähnliches Resultat, ebensowenig Taurin, das wegen der gleichzeitigen Anwesenheit einer Sulfon- und einer Amidogruppe geprüft worden war.

Hingegen wirkt Naphthionsäure in ähnlicher Weise wie Sulfanilsäure modifizierend auf die Eisenchloridreaktion ein. In 0,05‰iger Lösung zu Brenzcatechin- oder Adrenalinlösungen zugesetzt, bewirkt sie eine rötlichbraune Färbung nach Zutropfen von Eisenchlorid und gleichzeitig eine beträchtliche

[1]) Vgl. H. Meyer, Analyse und Konstitutionsermittelung organischer Verbindungen, 1903, S. 301.

[2]) Laignel-Lavastine, Compt. rend. de la Soc. de Biologie 1905.

Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber der einfachen Eisenchloridreaktion.

II. Verschärfung der Chromreaktion auf Adrenalin und Brenzcatechin.

Die im vorstehenden mitgeteilten Ergebnisse veranlaßten die Untersuchung, ob die Sulfanilsäure auch die bekannte Chromreaktion des Adrenalins beeinfluße.

In der Tat zeigte sich, daß auch diese Probe, welche immer unter Erhitzen des Reaktionsgemisches ausgeführt wurde, durch die Anilinsulfonsäure qualitativ wie quantitativ modifiziert wird. Die nach Zusatz der Sulfanilsäure eintretenden Farben sind zwar ähnlich der rotbraunen Färbung der gewöhnlichen Chromatreaktion, jedoch ist der rote Ton stärker hervortretend. Die Empfindlichkeit wird nur etwa um das 3fache gesteigert. Wenn aber auch die Grenzverdünnungen, bei denen die Chromreaktion einerseits (1:30000) und die Chromsulfanilreaktion andererseits (1:100000) eben erkennbare Resultate liefern, nicht sehr weit voneinander liegen, so sind die nach Zusatz der Sulfanilsäure auftretenden Farben ungleich satter und dunkler als bei der gewöhnlichen Chromreaktion; dieser Umstand erweckt die Hoffnung, daß die Sulfanilsäure zum mikrochemischen Nachweise des Adrenalins in den chromaffinen Organen von Wert sein könnte.

Während die Adrenalinreaktion durch Chromate bei Anwesenheit von Anilinsulfonsäure keine sehr beträchtliche Verstärkung erfährt, ist diese bei Verwendung von Brenzcatechin außerordentlich bedeutend (Tabelle III).

Tabelle III.

Brenzcatechinreaktion mit je 1 Tropfen 2%iger Natriumbichromatlösung in der Kochhitze.

Verdünnung der Brenzcatechinlösung	Mit Sulfanilsäure	Ohne Sulfanilsäure
1:30000	tief weinrot	gelb, später rötlichgelb
1:60000	weinrot	„ „ „
1:120000	rosa	gelb
1:300000	„	„
1:375000	„	„
1:500000	„	„
1:1000000	gelb (Chromatfarbe)	„

Auch andere Dioxybenzolderivate geben bei Zusatz von Sulfanilsäure charakteristische Farbenreaktionen mit Chromsalzen, und zwar:

Guajacol in konzentrierteren Lösungen beim Kochen kirschrot,

Protocatechualdehyd citronengelb bis orangegelb,

Resorcin hellgrün, dann kirschrot, dann blauviolett,

Hydrochinon in konzentrierteren Lösungen orangerot.

Wie die Eisenchloridreaktion wird die Chromreaktion auch durch Naphthionsäure beeinflußt, die an sich mit Chromsalzen Grünfärbung gibt. Die Adrenalinreaktion wird durch Naphthionsäurezusatz behindert, die Brenzcatechinreaktion fällt rotbraun aus, die Empfindlichkeit ist aber viel geringer als bei Sulfanilsäurezusatz.

Einfluß der Sulfanilsäure auf die Fränkel-Allerssche Adrenalinreaktion.

Auch diese schöne und ungemein wertvolle Reaktion,[1]) die nach der Angabe ihrer Entdecker auf der Bildung einer Jodo- und Jodosoverbindung des Adrenalins beruht, erfährt bei Anwesenheit von Sulfanilsäure tiefgreifende Veränderungen. Wie die beigegebene Tabelle zeigt, erfährt die Reaktion eine ganz kolossale Steigerung ihrer Empfindlichkeit, so daß selbst so geringe Mengen von Adrenalin, die keine Ehrmann-Reaktion mehr geben, noch deutlich angezeigt werden. Dabei wird, wie auch die Tabelle zeigt, der schöne rosenrote Farbenton der Fränkel-Allersschen Reaktion in einen rötlich gelben bis rein gelben umgewandelt.

Leider büßt diese ungemein scharfe Reaktion dadurch sehr viel an Brauchbarkeit ein, daß durch den Sulfanilsäurezusatz die Spezifizität, die der außerordentliche Vorzug der Fränkel-Allersschen Reaktion ist, bedeutend leidet. Brenzcatechin, Guajacol, Protocatechualdehyd und Hydrochinon geben — besonders in verdünnteren Lösungen — ähnliche Färbungen. Hingegen geben Resorcin, Harnstoff, Harnsäure, Tyrosin, Kreatinin, Leucin und andere Substanzen keine Farbenreaktionen.

---

[1]) S. Fränkel und R. Allers, diese Zeitschr. 18, 40, 1909.

Tabelle IV.

Adrenalinreaktionen mit Jodsäure nach Fränkel-Allers.

2 ccm Adrenalinlösung[1]) + {1 ccm Wasser bzw. 1 ccm Sulfanilsäurelösung} + 2 ccm Natriumbijodat + 1 ccm 10%ige Phosphorsäure.

Verdünnung	Reaktion mit Sulfanilsäurelösung	Reaktion mit destill. Wasser
1:50000	rötlich gelb	rosenrot
1:100000	„ „	„
1:500000	„ „	farblos
1:625000	gelb	„
1:830000	gelblich	„
1:1250000	„	„
1:5000000	„	„
1:6250000	„ ?	„
Kontrolle ohne Adrenalin	farblos	„

Auch auf diese Reaktion wirkt Naphthionsäure in ähnlicher Weise wie die Anilinsulfonsäure modifizierend ein. Die bei Zusatz von Naphthionsäure ausgeführte Fränkel-Allerssche Reaktion zeigt im allgemeinen violette, in den Grenzverdünnungen gelbliche Farbentöne. Hydrochinon gibt bei dieser Reaktion keine Färbung.

Tabelle V.

Fränkel-Allerssche Reaktionen bei Gegenwart von Sulfanilsäure- und Naphthionsäurelösungen nach 60 Sekunden langem Verweilen im kochenden Wasserbade.

Substanz	Zusatz	Reaktion
Adrenalin 1:50000	+ Sulfanilsäure	rötlich gelbbraun
„ 1:500000		rötlich gelb
„ 1:50000	+ Naphthionsäure	violett
„ 1:500000		„
Brenzcatechin 1:50000	+ Sulfanilsäure	(rötlich) gelbbraun
„ 1:500000		rötlich gelb
„ 1:50000	+ Naphthionsäure	rotviolett
„ 1:500000		„
Guajacol 1:50000	+ Sulfanilsäure	rötlich gelb
„ 1:500000		„ „
„ 1:50000	+ Naphthionsäure	violett
„ 1:500000		„ (?)

[1]) Diese nicht ganz frische Adrenalinlösung zeigte bei 1:1000000 positive, bei 1:5000000 negative Ehrmann-Reaktion.

III. Über eine scheinbare postmortale Adrenalinbildung.

Abelous, Soulié und Toujan[1]) fanden, daß Nebennierenbreie mit Autolysaten oder mit in Fäulnis befindlichen tierischen Substanzen versetzt, eine Vermehrung ihres Adrenalingehaltes erkennen lassen, und schließen daraus, daß die Nebennierenzellen post mortem aus in den Autolysaten befindlichen Stoffen Adrenalin zu bilden imstande seien. Die Vermehrung des Adrenalins, die sich sofort nach dem Zusatz des autolysierten oder gefaulten Materials zeige, bestimmten sie mit ihrer kolorimetrischen Jodmethode.[2])

In der Absicht, diese für die Frage nach den Muttersubstanzen des Adrenalins gewiß hoch bedeutsame Angabe nachzuprüfen, untersuchte ich, wie sich die Ehrmannsche Pupillenreaktion in einerseits mit Wasser, anderseits mit Faulflüssigkeiten versetzten Nebennierenbrei-Verdünnungen verhalte.

Da zeigte sich nun, daß in der Tat die mit fauligem Material gemengten Verdünnungen eine stärkere und rascher eintretende Mydriasis gaben. Höhere Verdünnungen des Nebennierenbreies mit Wasser gaben keine Ehrmannsche Reaktion mehr, während die korrespondierenden mit Faulflüssigkeit bereiteten Verdünnungen noch starke Pupillenerweiterung hervorriefen.

Jedoch erwies sich diese Mydriasis als eine von dem Meltzer-Ehrmannschen Phänomen verschiedene Erscheinung dadurch, daß sie nach einigen (ungefähr 4 bis 6) Stunden vollkommen zurückging, ja sogar von einer hochgradigen Myose abgelöst wurde, während bekanntlich die durch Adrenalin bewirkte Erweiterung des Sehloches bestehen bleibt.

Kontrollversuche ergaben dann, daß die verwendeten Faulflüssigkeiten an sich die Fähigkeit besitzen, solche durch die Raschheit ihres Ablaufes sich von der Adrenalinmydriasis unterscheidende Pupillenerweiterungen hervorzurufen. Die

---

[1]) Abelous, Soulié et Toujan, Influence des extraits . ; . etc. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 57, 589, 1905, II.

[2]) Abelous, Soulié et Toujan, Dosage colorimétrique de l'adrénaline. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 57, 301, 1905, II.

Faulflüssigkeiten verdanken diese Wirksamkeit auf die Iris des Froschauges einem kochbeständigen, alkohollöslichen Stoffe.[1])

Da die Nebennierenbrei-Verdünnungen mit Wasser nach 6 Stunden bei eingelegten Froschaugen eine stärkere Mydriasis hervorriefen als mit Faulflüssigkeiten angelegte Verdünnungen, darf wohl gesagt werden, daß die mit der Ehrmannschen Methode ausgeführte Nachprüfung der Angabe von Abelous, Soulié und Toujan die Resultate dieses Forschers nicht zu bestätigen vermochte: Der Zusatz von Faulflüssigkeiten oder von Autolysaten führte also in meinen Versuchen zu keiner mit der Ehrmannschen Reaktion erkennbaren Anreicherung von Adrenalin.

Hingegen fiel, in völliger Übereinstimmung mit den Angaben der Franzosen, die Jodreaktion in der mit Faulflüssigkeit versetzten Aufschwemmung der Nebennierenzellen stets intensiver aus als in jenen, die nur mit Wasser versetzt worden waren. Da aber die mit der Ehrmann-Methode erhaltenen Resultate der Annahme einer postmortalen Vermehrung des Adrenalins unter den verwendeten Versuchsbedingungen widersprachen, mußte daran gedacht werden, ob nicht die Faulflüssigkeiten und Autolysate Stoffe enthalten, welche das Zustandekommen der Jodreaktion fördern, etwa in der Weise, wie nach dem vorhin Besprochenen die Sulfanilsäure andere Adrenalinreaktionen verstärkt.

Ich verwendete zur Untersuchung dieser Frage an Stelle der Nebennierenbreie reine Adrenalinlösungen und Faulflüssigkeiten, die aus 36 bis 48 Stunden lang faulendem Rindfleisch durch Auspressen mittels hydraulischer Presse und Filtration durch Papier gewonnen worden waren. Mit diesen putriden Säften gemengte Adrenalinlösungen zeigten nun in der Tat Jodlösungen gegenüber ein anderes Verhalten als Adrenalinlösungen derselben Konzentration ohne diesen Zusatz; während nämlich

---

[1]) Es liegt nahe, an das Phenylalanin zu denken, das nach Pick und Pineles (Verhandl. d. Kongr. f. inn. Med. 1908) ebenso wie das Tyrosin mydriatische Wirkung auf die Pupille des enucleierten Froschauges besitzt.

die letzteren mit Jod[1]) rein rosenrote Farbentöne geben, die nicht sehr von denjenigen verschieden sind, wie sie beim Abstehen von Adrenalinlösungen am Lichte entstehen, weisen die mit Faulsäften gemengten Lösungen eine rotviolette Farbe, die der verdünnter Lösungen von übermangansaurem Kali ähnlich sind, auf. Die violette Farbe ist besonders bei verdünnten Adrenalinlösungen deutlich, während bei konzentrierten die blaue Komponente das Violett mehr in den Hintergrund tritt. Bei längerem Stehen nimmt die rosenrote Farbe der ohne fauligen Zusatz angestellten Reaktion rasch ab, während die mit Faulflüssigkeit versetzten Proben gefärbt bleiben, jedoch einen allmählichen Übergang ihrer Farbe aus dem Violetten ins Rote bzw. ins Rosa erkennen lassen.

Tabelle VI.

Menge der Adrenalinlösung (Takamine 1 ‰)	Mit 2 ccm dest. Wasser		Mit 2 ccm Faulflüssigkeit	
	sofort	nach 2½ Std.	sofort	nach 2½ Std.
0	—	—	farblos	farblos
5 Tropfen	licht rosenrot[2])	farblos	licht violett	rosa
10 "	" "	"	violett	"
15 "	rosenrot	"	"	"
20 "	"	"	rotviolett	rot
25 "	"	schwach rosenrot	"	"

Hand in Hand mit dieser qualitativen Änderung der Jodreaktion durch Faulsäfte geht auch eine Erhöhung der Empfindlichkeit, indem bei sehr verdünnten Adrenalinlösungen, die an sich keine Jodreaktion mehr geben, die violette Färbung bei Zusatz von Faulflüssigkeiten + Jodlösung noch deutlich erkennbar ist.

Die Frage, welchen Bestandteilen die Faulflüssigkeiten und Autolysate ihre Einwirkung auf die Jodreaktion verdanken,

[1]) Die Jodreaktionen wurden in der von Abelous, Soulié und Toujan angegebenen Weise ausgeführt: Zusatz von $^{n}/_{10}$-Jodlösung im Überschuß, Hinzufügen von Stärkekleister und Entfernen des Jodüberschusses durch Natriumhyposulfit.

[2]) Alle Proben wurden durch Zentrifugieren geklärt.

kann vorläufig hier noch nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Jedoch ergaben die zur Klärung dieser Frage angestellten Versuche mit Gewißheit, daß reines Alanin und reines Phenylalanin in gleicher Weise eine Verstärkung der Jodreaktion verursachen. Es verdient hervorgehoben zu werden, daß bei Verwendung von Phenylalanin die Jodreaktion nicht jene violetten Töne zeigt, die bei Zusatz von meinen Faulflüssigkeiten und auch bei Alaninzusatz auftreten, sondern die gleiche rosenrote Farbe gibt, die Adrenalinlösungen ohne Zusatz bei der Jodreaktion liefern. Jedoch ist die Farbe in den Röhrchen, die außer dem Adrenalin auch Phenylalanin enthalten, dunkler und röter als die gleiche Adrenalinmengen enthaltenden Kontrollproben ohne Phenylalanin.

Diese Tatsachen machen es verständlich, daß Abelous, Soulié und Toujan auf Grund ihrer kolorimetrischen Adrenalinbestimmung mittels Jodreaktion bei mit Autolysaten und Faulsäften versetzten Nebennierenbreien höhere Werte fanden als bei den ohne solche Zusätze untersuchten. Jedoch handelt es sich nicht um eine postmortale Adrenalinbildung durch die überlebenden Zellen, sondern um eine Verschärfung des chemischen Nachweises.

Zusammenfassung.

Beim Einwirken aromatischer Amidosulfonsäuren (α-Naphthylaminsulfonsäure, p-Amidobenzolsulfonsäure) auf Brenzcatechin und auf Adrenalin findet in neutraler und in schwach saurer Lösung bei Zimmertemperatur eine Umsetzung statt, die eine Änderung der Eisenchlorid-, Chromat- und der Fränkel-Allersschen Reaktion zur Folge hat.

Gleichzeitig kommt auch eine mehr oder minder bedeutende Steigerung der Empfindlichkeit zustande. Die Reaktionen unter Zusatz von Sulfanil- bzw. Naphthionsäure übertreffen alle anderen Adrenalinreaktionen an Empfindlichkeit, sind aber weniger spezifisch als die Fränkel-Allerssche Probe.

Für mikrochemische und histologische Zwecke dürfte die durch Sulfanilsäure bedingte Modifikation der Eisen- und Chromreaktion von Wert sein.

Die Jodreaktion des Adrenalins wird durch Alanin und durch Phenylalanin, vielleicht auch noch durch andere Eiweißabbauprodukte verstärkt; dieser Umstand erklärt die Angabe von Abelous, Soulié und Toujan, daß der Adrenalingehalt von Nebennierenbreien nach Zusatz von Faulflüssigkeiten oder Autolysaten zunimmt. In Wirklichkeit handelt es sich nicht um eine postmortale Produktion des Adrenalins, sondern um eine Verschärfung des chemischen Nachweises.

Versuche, die hier geschilderten Methoden zur Bearbeitung biologischer Fragen zu verwenden, wurden in Angriff genommen.

Vorstudien über Gicht.

Von

H. Bechhold und J. Ziegler.

Löslichkeit von Harnsäure und Natriumurat in Serum. — Beeinflussung der Harnsäure- und Uratausscheidung aus Serum durch anorganische Elektrolyte. — Der Einfluß von Radiumemanation.

(Eingegangen am 14. Juli 1909.)

Bei Betrachtungen über die Harnsäureausscheidung des Gichtikers im Organismus (also nicht durch den Harn) müssen wir drei Vorgänge unterscheiden:

1. die Erkrankung des Nucleinstoffwechsels;

2. die Bedingungen für das Ausfallen der vorhandenen Harnsäure und Urate, abhängig von den physikalischen und chemischen Verhältnissen, in erster Linie des Blutes;

3. die Lokalisation der Harnsäure an bestimmten Organen.

Wir wollen hier absehen von den zahlreichen Arbeiten über Nucleinstoffwechsel, die gerade in den letzten Jahren veröffentlicht wurden, ebenso von den interessanten Beobachtungen von Almagia, Pfeiffer, Brugsch und Citron[1]), welche nachwiesen, daß Knorpel aus verdünnten Lösungen von Harnsäure und harnsaurem Natrium die Harnsäure in erheblicher Menge zu absorbieren und sie in krystallinischer Form abzulagern, also zu lokalisieren vermag. — Unsere Untersuchungen beschäftigen sich mit den Lösungs- bzw. Ausfallbedingungen der Harnsäure und des harnsauren Natriums in Blutserum in Abhängigkeit von Stoffen, die normalerweise darin vorkommen oder die zugeführt werden. Sehen wir, daß durch bestimmte Stoffe, beispielsweise Magnesiumsalze, das Ausfallen von Natriumurat verhindert wird, so dürfen wir auch mit größter Wahrscheinlichkeit annehmen, daß damit die lokalisierte Ausscheidung, z. B. an Knorpel, Gelenken, sich vermindert.

---

[1]) Vgl. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 5, 401, 1908.

So wertvoll auch die klassischen Arbeiten von His und Paul[1]) sowie die höchst interessanten Veröffentlichungen von Gudzent[2]) über die Löslichkeitsbedingungen der Harnsäure in wässerigen Lösungen vom physikalisch-chemischen Standpunkt aus sind, durfte man doch von Serumlösungen neue, besonders für die Medizin interessante Resultate erwarten, zumal sich hier Gelegenheit bot, die Erkenntnisse der in den letzten Jahren so fruchtbaren Kolloidchemie auf das Problem anzuwenden.

Experimenteller Teil.

Zunächst war es unsere Aufgabe, die Löslichkeitsverhältnisse der Harnsäure und Natriumurate in Serum einer Prüfung zu unterziehen, wobei sich verschiedene neue Beobachtungen ergaben; daran schloß sich die Fragestellung: Welche Stoffe begünstigen, welche hemmen das Ausfallen von Harnsäure bzw. Uraten aus Serum? — Stets mit Rücksicht auf die Vorgänge im Organismus wurden sämtliche Versuche bei 37° C vorgenommen.

Harnsäure.

Wir verwandten Harnsäure verschiedener Herkunft, da die Löslichkeit der Harnsäure in Wasser von nicht nachweisbaren Verunreinigungen beeinflußt wird. Irgend erhebliche Unterschiede konnten wir jedoch bei unseren Versuchen nicht bemerken. Jedenfalls spielen die Differenzen der Sera eine viel größere Rolle als die der Harnsäure.

Die Harnsäure wurde bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und damit auch in gewissem Grade sterilisiert. Als Serum diente Rinderblutserum. Die Versuche wurden in ausgedämpften Jenaer Gläsern vorgenommen, die mit Gummistopfen verschlossen waren. Alle Maßnahmen wurden streng steril durchgeführt.

Durch nachstehend beschriebene bekannte Eigenschaft des Serums gegenüber Harnsäure wurde unsere Untersuchung außerordentlich vereinfacht. Schon His und Paul erwähnen das Auftreten kolloider wässeriger Lösungen der Harnsäure und damit verbundener Übersättigungserscheinungen. In

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 1 bis 42 und 64 bis 78.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 150ff., 60, 25ff. und 30ff.

noch viel höherem Grade machten sich diese bei Serum bemerkbar: Digeriert man Serum 1 Stunde lang bei 37° mit Harnsäure und filtriert bei 37°, so erhält man ein Filtrat, in dem zunächst mikroskopisch keine Harnsäurekrystalle oder Urate nachweisbar sind. Läßt man dieses Filtrat 24 Stunden bei 37° stehen, so scheidet sich ein dicker Bodensatz aus.

Schon Ritter hat diese Wiederabscheidung gelöster Harnsäure aus Serum beobachtet, wie Wiener[1]) anführt. Ferner hat sich Trenkner[2]) eingehend damit befaßt. Die Auffassung, die Trenkner über dieses Phänomen hat, scheint uns nicht ganz zutreffend: er meint, daß in dem Serum außerhalb des Körpers bei höherer Temperatur (es kommt hier nur die Bluttemperatur in Betracht) schon nach wenigen Stunden Veränderungen vor sich gehen, welche die Lösungsfähigkeit der Flüssigkeit für Harnsäure beeinträchtigen. Diese Annahme ist uns nicht wahrscheinlich, denn man kann, wie später erwähnt wird, solches Serum wiederholt mit Harnsäure (in geeignetem Zustand) „übersättigen" und wiederholt Ausscheidung daraus erzielen. Eine Erklärung für das Phänomen vermögen wir allerdings auch nicht zu geben, denn eine Übersättigung im üblichen Sinn kann nicht stattfinden, da ja Lösung und Ausscheidung bei konstanter Temperatur erfolgen. — Daher haben wir auch in der Folge den Ausdruck „Überfüllung" statt des Wortes „Übersättigung" gebraucht, das hier zu Mißverständnissen führen könnte. — Wir verdanken Prof. Bredig Beispiele, aus denen hervorgeht, daß das Phänomen kein alleinstehendes ist, daß es vielmehr die Folge sehr komplizierter Vorgänge sein kann. — Ein genaues Studium des Bodenkörpers wird vielleicht den Schlüssel zu dem beschriebenen Phänomen bieten. — Wir beschränken uns zunächst auf die Beschreibung unserer Beobachtungen.

Unter dem Mikroskop hat die weiße Ausscheidung die Form feiner Nadeln und keineswegs das übliche Aussehen der Harnsäurekrystalle. Sammelt man den Niederschlag, saugt ihn ab, wäscht ihn mit sehr wenig Wasser aus und krystallisiert die Lösung unter dem Mikroskop, so erhält man die bekannten rhombischen Täfelchen der Harnsäure. Neben

[1]) Ergebnisse der Physiologie 2.

[2]) Centralbl. f. inn. Med. 1904, Nr. 45.

den Nadeln findet man zuweilen verschwindende Mengen körniger Massen, die aus Spuren von Uraten (Natrium, Kalium oder Ammonium) bestehen mögen.]

Der mit sehr wenig Wasser ausgewaschene Rückstand verbrennt auf dem Platinblech fast rückstandslos. Eine Bestimmung des Ascherückstandes, der durch Schwefelsäure in das Sulfat überführt und als Na_2SO_4 berechnet wurde, ergab folgendes:

0,2254 g Rückstand ergaben 0,0130 g Na_2SO_4 = 0,0042 g Na.

In Mononatriumurat sind 12,1 % Na.

In obiger Substanz sind 1,86 % Na.

Somit könnten höchstens 15,3 % des Gesamtniederschlages aus Mononatriumurat bestehen.[1])

Filtriert man das Serum von jenem Niederschlag ab und läßt das Filtrat weiter im Brutschrank stehen, so erhält man keine weitere Ausscheidung.

Wenn wir im folgenden den ausgefallenen Bodenkörper als „Harnsäure" bezeichnen, so geschieht dies nur der Kürze halber, ohne damit ein Urteil über die wahre Natur des Bodenkörpers präjudizieren zu wollen.

Das beschriebene Ausfallen von „Harnsäure" ist jedoch an bestimmte Bedingungen geknüpft, und es zeigt sich ein nicht unwesentlicher Unterschied zwischen frischem und inaktiviertem Serum, d. h. solchem, das eine Stunde lang auf 58° erhitzt war.

Aus frischem Serum fällt unter allen Umständen die überschüssige Harnsäure binnen 24 Stunden wieder aus. Bei inaktiviertem Serum ist jedoch das Ausfallen binnen 24 Stunden zuweilen an die Form der Flüssigkeitsoberfläche und das Vorhandensein eines nicht zu kleinen Luftraumes über der Lösung geknüpft. Stellt man sich ein überfülltes in-

---

[1]) Trenkner (l. c. S. 1128) macht hierüber eine irrtümliche Angabe, die hiermit richtiggestellt sei. Er schreibt, daß sich aus der mit Harnsäure übersättigten Serumlösung ein Sediment abscheide, welches, wie die mikroskopischen und chemischen Untersuchungen (feine Krystallnadeln von charakteristischem Aussehen, Murexidprobe) lehrten, aus Mononatriumurat bestand. Die Murexidprobe beweist nichts, denn sie erscheint sowohl bei Harnsäure wie bei Mononatriumurat. Das „charakteristische" Aussehen der Krystallnadeln ist eben nicht charakteristisch.

aktiviertes Harnsäureserum her, und verschließt es in einer vollgefüllten Flasche derart, daß keine Luftblase zwischen dem am besten paraffinierten Kork und dem Serum sich befindet, oder überdeckt es mit Paraffinum liquidum oder Öl, so findet man nach 24 Stunden, zuweilen sogar nach 48 Stunden bei einem hierzu geeigneten Serum noch keine Ausscheidung. Ist jedoch die Flasche nicht ganz gefüllt, das heißt, reicht das Serum nicht bis in die Verengung des Flaschenhalses, so ist die überschüssige Harnsäure stets nach 24 Stunden vollkommen abgeschieden, auch wenn das Serum mit Öl überdeckt war. Man kann leicht beobachten, daß die ersten Ausscheidungen meist an dem Rand des Glases erfolgen, wo Serum, Glas und Luft bzw. Öl sich berühren, daß von hier aus die Keime gesät werden, die den vollen Ausfall der überschüssigen Harnsäure bewirken.[1])

Die Erklärung scheint uns in dem höheren Hydroxylionengehalt des inaktivierten Serums zu liegen, das die Tendenz zur Krystallbildung herabsetzt. Dieudonné zeigte zuerst, daß durch Erwärmen auf 45° die Eiweißbestandteile des Serums verändert werden,[2]) und wie dann L. v. Liebermann[3]) nachwies, vermehrt sich die Hydroxylionenkonzentration von Serum erheblich mit dem Erwärmen; H. Sachs[4]) hat auf die zahlreichen dadurch bedingten Abweichungen in dem Verhalten des inaktivierten von dem frischen Serum hingewiesen.

Löslichkeit von Harnsäure in Serum.

Eine exakte Bestimmung der Löslichkeit von Harnsäure wurde von Taylor[5]) an kohlensäuregesättigtem Rinderserum ausgeführt. Er fand eine Löslichkeit von ca. 1:1000, während

[1]) Es sei betont, daß diese hier beschriebenen Erscheinungen keineswegs mit allen Sera gelingen. Wir benutzten Rinderserum verschiedener Herkunft; während bei manchen die obige Abhängigkeit der Ausscheidung von der Art der Oberfläche nie zu bemerken war, trat sie bei anderen regelmäßig auf. Eine Erklärung für das verschiedene Verhalten verschiedener Sera vermögen wir nicht zu geben.

[2]) Hygienische Rundschau 1902, Nr. 18.

[3]) Arch. f. Hygiene 1907.

[4]) Des modifications du sérum sanguin par le chauffage. Semaine médicale 24. 6. 1908.

[5]) Journ. of Biolog. Chem. 1, 177 bis 183.

nach His und Paul die Löslichkeit in Wasser von 18° rund 1:39500 ist,[1]) nach Gudzent bei 37° rund 1:15500.

Wir wandten eine einfache, aber nicht minder exakte Methode an, die zu ähnlichen, aber nicht genau gleichen Resultaten wie die von Taylor führte; die Differenz mag in der Kohlensäuresättigung des Taylorschen Serums liegen; vielleicht auch daran, daß wir inaktiviertes, das heißt auf 58° C erhitztes Serum benutzten.

Ein unten spitz verlaufendes Glasgefäß von $^1/_2$ l Inhalt wurde von Probe zu Probe mit je 200 ccm Serum gefüllt und steigende Mengen von Harnsäure (0,01 bis 0,25 g) beigefügt. Das Gefäß stand im Brutschrank (37°) und wurde in Abständen von 5 Minuten kräftig durchschüttelt, bis keine Harnsäure mehr in Lösung ging.

Im Lauf dieser Versuche kamen wir an einen Punkt, wo die ganze Blutserum-Harnsäureprobe gleichmäßig klar bei durchfallendem Licht erschien, und wo in dem spitzen Ende des Glasgefäßes nach längerer Ruhe makroskopisch keine Harnsäure mehr in ungelöstem Zustande erkennbar war. Die Löslichkeitsgrenze zeigte sich im Durchschnitt bei Harnsäure 0,17 bis 0,2, Blutserum 200,0, d. i. also rund 1:1200. Bei manchen Sera fanden wir auch ein Lösungsvermögen bis zu 1:1000, im Mittel also 1:1100. Dies ist die Überfüllungs-

---

[1]) Taylor sagt ganz richtig, daß die Löslichkeit der Harnsäure in Serum sich aus drei Größen zusammensetze: a) der im Wasser des Serums gelösten Harnsäure, b) dem seitens der Serumkolloide in Lösung gehaltenen Teil und c) dem in Form einer komplexen Verbindung (Nucleinsäuren u. a.) gelösten Anteil. Während der in Wasser gelöste Teil bekannt ist, war eine Trennung der sub b) und c) in Lösung gehaltenen Anteile nicht bestimmbar. Wir möchten darauf aufmerksam machen, daß dies unter Anwendung der Ultrafiltration heute keine Schwierigkeiten mehr bieten dürfte. Als Filtrat würde man eine Flüssigkeit erhalten, welche die Bestandteile a) + c) enthält; a) ist bekannt, daraus würde sich c) und b) ergeben. — Neuerdings haben Pauli und Sameo eine interessante Arbeit veröffentlicht über die Löslichkeitsbeeinflussung von Elektrolyten durch Eiweißkörper (diese Zeitschr. 17, 235 ff.). worin sie an einer verdünnten elektrolytfreien Lösung von Serumeiweiß nachwiesen, daß schwer lösliche Elektrolyte (auch Harnsäure) eine zum Teil sehr beträchtliche Erhöhung ihrer Löslichkeit bei Anwesenheit von Eiweißkörpern erfahren.

grenze[1]) bei 37°, denn solches Serum scheidet, wie S. 191 beschrieben, binnen 24 Stunden einen erheblichen Teil der Harnsäure wieder aus.

Die Füllungsgrenze wurde in folgender Weise bestimmt:

Mit überfülltem Harnsäureserum beschickte Röhrchen wurden mit abfallenden Mengen gewöhnlichen Serums verdünnt und mit einigen Harnsäurekrystallen geimpft. Es mußte nun ein Mischungsverhältnis geben, in dem gerade binnen 24 Stunden keine Harnsäure mehr ausfiel, z. B.:

Tabelle I.

Übersättigtes Harnsäureserum ccm	+	inaktiviertes Serum ccm	nach 24h bei 37°
4	+	6	—
5	+	5	—
6	+	4	+
7	+	3	××
8	+	2	×××
9	+	1	×××
10	+	0	×××

Der Versuch wurde mit einem überfüllten Harnsäureserum 1:1000 und mit einem 1:1100 durchgeführt. Daraus ergibt sich ein Aufnahmevermögen für Harnsäure in Serum:

bei 1:1000 von rund 1:1830
„ 1:1100 „ „ 1:2020
Mittel 1:1925.

Natriumurate.

In den Handbüchern der Chemie werden 2 Natriumurate unterschieden, das sogenannte „neutrale" oder Bi-Natriumurat $Na_2C_5H_2N_4O_3$, dessen Lösung in Wasser alkalisch reagiert, und das sogenannte „saure" oder Mononatriumurat $NaC_5H_3N_4O_3$, dessen Lösung in Wasser gegen Lackmus neutral reagiert. In Wahrheit existiert das Binatriumurat nur als feste Substanz und unter Verhältnissen, die im Organismus niemals auftreten können, nämlich in sehr stark alkalischer Lösung. Bringt man Bi-

[1]) Wir schlagen statt der Ausdrücke Sättigung und Übersättigung die Worte Füllung und Überfüllung vor, wenn sich gleichzeitig Kolloide im Lösungsmittel befinden. — Sättigung und Übersättigung sind insbesondere bei wässerigen Lösungen eindeutige, klar definierte Begriffe, deren ursprüngliche Bedeutung, auf kolloide Lösungen angewandt, nicht mehr zutrifft. Es ergeben sich so nur Mißverständnisse, die wir durch Verwendung anderer Ausdrücke vermeiden wollen.

natriumurat in Wasser, das neutral oder nur schwach alkalisch reagiert, oder in entsprechendes Serum, so zerlegt es sich in Mononatriumurat und NaOH. Leitet man in die stark alkalische Lösung des $Na_2C_5H_2N_4O_3$ Kohlensäure oder fügt $NaHCO_3$ zu, so scheidet sich ebenfalls Mononatriumurat aus. Wir können somit bei unseren Betrachtungen von der Existenz des Binatriumurats vollkommen abstrahieren, da es im Organismus als solches gar nicht in Frage kommt.[1])

Mononatriumurat stellten wir uns nach Bensch[2]) her und machten entsprechende Versuche wie mit Harnsäure. Eine Überfüllung von Serum ist bei 37° nur in so geringem Maße zu erzielen, daß sie für Versuchszwecke in dem Sinne wie bei Harnsäure nicht in Betracht kommt. Möglicherweise beruht auch diese ganz unbedeutende scheinbare Überfüllung in der Umlagerung des unbeständigen, etwas leichter löslichen Urats in das beständige, schwerer lösliche. Durch Einleiten von Kohlensäure vermag man nach 24 Stunden ganz geringe Ausscheidung zu bewirken, und man kann bei einem geeigneten Serum qualitativ analoge Unterschiede konstatieren wie bei Harnsäure, je nachdem man die Flasche bis an den engen Hals füllt und mit Öl bzw. paraffiniertem Kork abschließt oder nur halbgefüllt stehen läßt. Den Unterschied kann man noch etwas mehr markieren, indem man dann die Flaschen in den Eisschrank stellt. Aber, wie gesagt, die Ausscheidungen sind sehr gering. Hingegen kann man eine Übersättigung durch Zusatz von m/1 NaCl erzielen, der nach 24 Stunden im Brutschrank eine mäßige Ausscheidung von Mononatriumurat folgt.

Die Löslichkeit von Mononatriumurat in Serum bei 37°, welche analog wie bei Harnsäure bestimmt wurde, ergab 1:40000.

Die Löslichkeit in Wasser beträgt nach Gudzent bei 37°

für Natriumurat (unbeständig) 1:469
„ „ (beständig) . 1:710
„ Mischprodukte 1:665

[1]) Es sei hier nochmals auf die interessante Arbeit von Gudzent über 2 Reihen primärer harnsaurer Salze (Zeitschr. f. physiol. Chem. 60, 38 ff.) verwiesen. Er zeigt, daß die Harnsäure 2 Reihen primärer Salze bildet: eine bei 37° um 34% leichter lösliche unbeständige Reihe a-Salze, entsprechend der Lactamform = Lactamurat (unbeständig), die vom Moment ihrer Entstehung an in die schwerer lösliche übergeht, b-Salze = Lactimurat (beständig).

[2]) Liebigs Annal. d. Chem. 54, 189 ff.

Stellen wir die Ergebnisse nochmals kurz zusammen:

Löslichkeit von Harnsäure in Wasser bei 37° . . .	1:15500
„ „ „ „ Serum (Überfüllung) .	1:1100
„ „ „ „ „ (Füllung) . .	1:1925
„ „ Mononatriumurat in Wasser (Mischprodukt) . .	1:665
„ „ „ „ Serum (Mischprodukt) . .	1:40000

Wir finden also eine vollkommene Umkehrung der Verhältnisse: in Serum ist Harnsäure rund 20 mal leichter löslich als Mononatriumurat, in Wasser ist Mononatriumurat rund 60 mal leichter löslich als in Serum.

Auf die Bedeutung dieser Tatsachen für die Harnsäureausscheidung beim Gichtiker werden wir später zurückkommen.

Beeinflussung des Ausfallens von Harnsäure und Uraten.

Aus dem vorher Gesagten erhellt, daß wir mit zwei Arten von Harnsäure- und Uratlösungen operieren können: mit gefüllten und mit überfüllten. An der ersteren konnten wir die Stoffe untersuchen, welche das Ausfallen von Harnsäure begünstigen, sie mußten ein Ausfallen von Harnsäure bewirken, während die Kontrolle unverändert blieb. An der letzteren konnten wir die Stoffe untersuchen, welche das Ausfallen von Harnsäure hemmen, während die Kontrolle Harnsäure abschied.

Die nachstehenden Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt:

Wir stellten eine entsprechende Menge von mit Harnsäure gefülltem oder überfülltem Serum her und brachten davon je 5 ccm in eine Anzahl Reagensgläser; diesen setzten wir dann in steigender Menge Wasser bzw. Salzlösungen zu, die ebenfalls bei 37° mit Harnsäure gesättigt worden waren, und hielten die Gläser, mit Gummistopfen verschlossen, 24 Stunden lang bei 37°. Danach mußte sich durch direkten Augenschein oder bei der mikroskopischen Prüfung zeigen, ob eine Ausscheidung erfolgt war. Stets wurden natürlich entsprechende Kontrollen angesetzt.

In den folgenden Tabellen bezeichnen wir:

+++ = Krystalle in großer Anzahl,
++ = „ „ verminderter Anzahl,
+ = vereinzelte Krystalle (2 bis 3 im Gesichtsfelde bei Zeiß' Objektiv DD, Okular Nr. 2),
— = keine Krystalle.

Den Tabellenüberschriften ist beigefügt, ob gesättigtes oder übersättigtes Harnsäureserum verwandt wurde.

Welchen Einfluß hat die Verdünnung mit Wasser und physiologischer Kochsalzlösung auf Harnsäureserum und Mononatriumuratserum?

Tabelle II.

Harnsäureserum (überfüllt) ccm	+	Wasser (m. Harnsäure gesättigt) ccm	Nach 24 Std. bei 37°	Harnsäureserum (gefüllt) ccm	+	Wasser (m. Harnsäure gesättigt) ccm	Nach 24 Std. bei 37°
5	+	5	—	5	+	5	—
4	+	6	—	4	+	6	—
3	+	7	—	3	+	7	—
2	+	8	—	2	+	8	—
1	+	9	—	1	+	9	—
1	+	19	—	1	+	19	—
1	+	29	—	1	+	29	—
1	+	39	—	1	+	39	—
Kontrolle			+++	Kontrolle			—

Harnsäureserum (überfüllt) ccm	+	0,85% Kochsalzlösung (mit Harnsäure gesättigt) ccm	Nach 24 Std. bei 37°	Harnsäureserum (gefüllt) ccm	+	0,85% Kochsalzlösung (mit Harnsäure gesättigt) ccm	Nach 24 Std. bei 37°
5	+	5	++	5	+	5	—
4	+	6	+	4	+	6	—
3	+	7	—	3	+	7	—
2	+	8	—	2	+	8	—
1	+	9	—	1	+	9	—
1	+	19	—	1	+	19	—
1	+	29	—	1	+	29	—
1	+	39	—	1	+	39	—
Kontrolle			+++	Kontrolle			—

Tabelle III.

Mononatriumuratserum (überfüllt) ccm	+	Wasser (mit Mononatriumurat gesättigt) ccm	Nach 24 Std. bei 37°	Mononatriumuratserum überfüllt und mit NaCl m/1 imprägniert ccm	+	Wasser (mit Mononatriumurat gesättigt) ccm	Nach 24 Std. bei 37°
5	+	5	—	5	+	5	+
4	+	6	—	4	+	6	+
3	+	7	—	3	+	7	–(+2)
2	+	8	—	2	+	8	—
1	+	9	—	1	+	9	—
1	+	19	—	1	+	19	—
1	+	29	—	1	+	29	—
1	+	39	—	1	+	39	—
Kontrolle			+	Kontrolle			+++

Mononatriumuratserum überfüllt (ohne NaCl) ccm	+	0,85% Kochsalzlösung (mit Mononatriumurat gesättigt) ccm	Nach 24 Std. bei 37°	Mononatriumuratserum mit NaCl m/1 imprägniert ccm	+	0,85% Kochsalzlösung (mit Mononatriumurat gesättigt) ccm	Nach 24 Std. bei 37°
5	+	5	—	5	+	5	+++
4	+	6	—	4	+	6	++
3	+	7	—	3	+	7	+(++)
2	+	8	—	2	+	8	+
1	+	9	—	1	+	9	—
1	+	19	—	1	+	19	—
1	+	29	—	1	+	29	—
1	+	39	—	1	+	30	—
Kontrolle (ohne NaCl)			—	Kontrollen, mit NaCl m/1 imprägniert			+++

Man hätte a priori erwarten dürfen, daß Verdünnung mit Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung selbst bei gefülltem (nicht nur bei überfülltem) Harnsäureserum eine Ausfällung von Harnsäure bewirkt, da Harnsäure in Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung rund 8 bzw. 14 mal weniger löslich ist als in Serum. Die Versuche ergaben jedoch das Gegenteil: die Verdünnung hinderte sogar bei überfülltem Harnsäureserum die Ausscheidung. Es spricht dies dafür, daß bei der erhöhten Löslichkeit der Harnsäure in Serum weniger die Nucleinsäuren, als die Adsorption durch die Serumkolloide in Betracht kommt. Daß die Lösung von Mononatriumurat in Serum durch Verdünnung mit Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung begünstigt wird, konnte man erwarten.

Welchen Einfluß haben H- und OH-Ionen?

Wie bereits His und Paul[1]) anführen, findet sich in der Literatur wiederholt die Angabe, daß Harnsäure in verdünnter Salzsäure leichter löslich sei als in Wasser.

Aus den Forschungen von His und Paul ergibt sich hingegen unzweifelhaft, daß Gegenwart starker Salzsäure in wässerigen Lösungen eine Löslichkeitsverminderung der Harnsäure zur Folge hat. Es wäre natürlich vollkommen irrtümlich, aus dieser Tatsache auch auf eine Löslichkeitsverminderung in Serum bei Zusatz von Salzsäure schließen zu wollen. Ähnlich irrtümlich wären analoge Schlüsse bezüglich des Zusatzes von NaOH. Daß alle derartigen Übertragungen aus unserer Kenntnis

[1]) l. c. S. 64.

der wässerigen Lösungen auf die serumhaltigen falsch sind, ergibt sich aus nachstehender Tabelle.

5 ccm überfülltes Harnsäureserum nach 24 Stunden bei 37° im Brutschrank ergab bei einem Gehalt von:

Tabelle IV.

	m/10	m/15	m/20	m/25	m/30	m/35	0 (Kontrollen)
HCl				—	+ (1)	+ (1—2)	+++
NaOH	—	+ (1)	+ (3—4)				+++

Die Zahlen in Klammern oben bedeuten 1, 3 usw. Krystalle im Gesichtsfeld.

Wir ersehen, daß sowohl H- (in Form von HCl) wie OH-Ionen (in Form von NaOH) die Ausscheidung von Harnsäure aus Serum behindern. Es ist dies um so auffallender, als Natriumurat in Serum so sehr viel schwerer löslich ist als Harnsäure.

Analoge Versuche wurden mit Mononatriumurat angestellt, bei dem durch Zusatz von m/1 NaCl eine Überfüllung und Ausscheidung nach 24 Stunden erzwungen war:

Tabelle V.

	m/30	m/40	m/50	m/60	0 (Kontrolle)
HCl	— bis +	+	+ bis ++	++	+ bis ++

Höhere Konzentrationen als m/30 HCl (z. B. m/20 usw.) koagulieren unter den vorliegenden Bedingungen das Eiweiß:

	m/1	m/5	m/10	m/15	m/20	m/30	m/40	m/50	m/60	0 (Kontrollen)
NaOH	—	—	—	—	—	—	0 bis +	+	+	+ bis ++

Wir sehen somit, daß H-Ionen etwas, besonders aber OH-Ionen die Ausscheidung von Mononatriumurat hemmen. Bei sehr geringer H-Ionenkonzentration (vgl. m/60 HCl) könnte vielleicht eine Begünstigung der Uratausscheidung erfolgen.

Die Wirkung anorganischer Salze.

Die Versuche wurden ganz in der bisherigen Weise ausgeführt.

Um durch Zusatz von, wenn auch fremden Krystallen zu überfülltem Harnsäureserum ein eventuelles Ausfallen von Harnsäure zu vermeiden, haben wir, wo es angängig war, solche Substanzen zuvor in einer minimalen Menge Wasser gelöst.

Zu Serum, das mit Mononatriumurat gesättigt war, wurde je m/1 KCl, LiCl, NaCl, NH_4Cl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $KHCO_3$, $NaHCl_3$,

K_2CO_3, Na_2CO_3, $(NH_4)_2CO_3$, K_2SO_4 und NaJ gefügt. Nur NaCl m/1 gab binnen 24 Stunden eine Ausscheidung (++), sämtliche übrigen waren auch nach 48 Stunden unverändert. Die Ausscheidungsverhältnisse für natriumuratgesättigtes Serum durch NaCl sind die folgenden:

	m/1	m/5	m/10	Kontrolle
NaCl	++	—	—	—

Tabelle VI. Serum mit Harnsäure

	Überfüllt (sämtliche Kontrollen +++)		Gefüllt (sämtliche Kontrollen —)					
	m/5	m/10	m/5	m/10	m/15	m/20	m/30	m/40
KCl	—	∓(1)						
LiCl	++	+++						
NaCl		+++	++	∓				
NH_4Cl		+++	+++	+++	+++	++	—	
$MgCl_2$	—	∓(1)						
$CaCl_2$	+++		++	++	++	—	—	
KBr	+(1–2)	++						
LiBr	+	++						
NaBr			+(2)	∓(1)				
KJ	+	++						
NaJ		+++	++	+(1-2)				
$KHCO_3$ . . .			∓(1)	—				
$NaHCO_3$ . . .		+++	—	—				
K_2CO_3	—	∓(1)						
Li_2CO_3[1] . . .				+(2–3)	∓	—		
Na_2CO_3 . . .		+++	+++	++	++	++	+	—
$(NH_4)_2CO_3$ . .		+++	+++	+++	+++	+++	±	—
K_2SO_4		+	+	—				
Li_2SO_4	+	+bis++						
Na_2SO_4 . . .		+++	+++	++	++	±(1)	—	
$(NH_4)_2SO_4$ . .		+++	+++	+++	+++	+++	+(2)	±(1)
$MgSO_4$[2] . . .	—	—						
NaH_2PO_4 . .	—(?)							
Na_2HPO_4 . .	+++							
Na_3PO_4 . . .	+(++)	++						
$KClO_3$	—	++						
KCNS	—	+(lange Nadeln)						
NaCNS . . .	+++	+++						
NH_4CNS . . .	+++	+++						

[1]) Li_2CO_3 löst sich in harnsäurehaltigem Serum auch bei m/20 nur teilweise.

[2]) Eine besondere Untersuchung zeigte uns, daß noch $MgSO_4$ m/20, ja in einem Falle sogar $MgSO_4$ m/130 —, m/260 + übersättigtes Serum hemmte.

Tabelle VII.

Je 5 ccm mit **Mononatriumurat** gefülltes und durch Zusatz von NaCl m/l **überfülltes Serum.**

Sämtliche Kontrollen ++.

	m/5	m/10	m/15	m/20
KCl	+	+	+ bis ++	++
LiCl	—	+ bis ++		
NaCl . . .	++	++		
NH_4Cl . . .	+ bis ++			
$MgCl_2$ . . .	—	+ (1—2)		
$CaCl_2$ . . .	—	+ bis ++		
$KHCO_3$ . .	— bis +	++		
$NaHCO_3$ . .	+			
K_2CO_3 . . .	—	—	+	+
Na_2CO_3 . .	+			
$(NH_4)_2CO_3$.	++			
K_2SO_4 . . .	—	+ bis ++		
Li_2SO_4 . . .	+			
Na_2SO_4 . .	++			
$(NH_4)_2SO_4$.	+ bis ++			
$MgSO_4$ . . .	—	0 bis +		
NaH_2PO_4 .	+			
Na_2HPO_4 .	+			
Na_3PO_4 . .	+			

Aus den Tabellen VI und VII ergibt sich, daß bei der Harnsäure- und Natriumuratausscheidung bzw. -Hemmung die **Kationen** die wesentliche Rolle spielen, und zwar in der Reihenfolge

hemmend fördernd

K > Li Na < NH_4

Bei Natriumurat können Na und NH_4 zuweilen ihre Rollen vertauschen.

Von zweiwertigen Kationen wurden nur die im Organismus vorkommenden Ca und Mg geprüft, von denen Ca fördernd wirkt, während Mg einen eminent hemmenden Einfluß hat.

Der Einfluß der **Anionen** tritt nicht so deutlich und nicht so eindeutig in die Erscheinung. Im ganzen dürfte die folgende Reihe (je nach dem Kation können auch kleine Differenzen eintreten) zutreffend sein: **hemmend** HCO_3 > Cl > Br > J > CO_3 > SO_4 **fördernd.** Ganz aus der Reihe fällt das $MgSO_4$, das weit stärker hemmend wirkt als $MgCl_2$. Vergleichen wir

Tabelle VI (Wirkung der Salze auf die Harnsäureabscheidung) mit Tabelle VII (Wirkung der Salze auf die Natriumuratabscheidung), so sehen wir, daß letztere mit wenigen Ausnahmen ein Ebenbild der ersteren ist, nur sind die gewaltigen Unterschiede abgeflacht, gemildert; aus einem Hochrelief ist ein zartes Flachrelief geworden.

Wollen wir die Ergebnisse unserer Untersuchung auf Pathologie und Therapie der Gicht anwenden, so müssen wir uns zunächst klar darüber sein, in welcher Form die Harnsäure im Organismus auftritt. Gerade hierüber sind die Daten indessen äußerst arm: beim Durchblättern der Literatur findet man unzählige Angaben über den „Harnsäure"-Gehalt in allen möglichen Organen und bei allen denkbaren Diäten; aber ob es sich um freie Harnsäure oder um Urate handelt, darüber findet sich meist kein Wort. Und doch ist das der springende Punkt der ganzen Frage.

Aus dem Seite 195 und 196 Mitgeteilten ergibt sich, daß das Blutserum ca. 0,05‰ (oder 500 mg in 1 l) Harnsäure enthalten kann, ohne daß eine spontane Ausscheidung zu erfolgen braucht; ist aber diese gleiche Menge in Form von Natriumurat vorhanden, so muß sich der größte Teil der Harnsäure abscheiden, ein Ergebnis, das allen bisherigen Annahmen widerspricht. Ist ein Gehalt von 25 mg Natriumurat (entsprechend knapp 22 mg Harnsäure) in 1 l Blutserum erreicht, so muß jede weitere Zufuhr mit einer Ausscheidung von Natriumurat einhergehen. Im normalen Blut können höchstens Spuren von Harnsäure nachgewiesen werden. Nach Analysen von Klemperer, Magnus-Levy und Salomon schwanken die Harnsäuregehalte von Gichtkranken zwischen 30 und 80 mg.

Im Handb. d. Pathol. d. Stoffw. von C. v. Noorden 2, 163 steht: „Die analytisch gefundene Konzentration reicht bei weitem nicht hin, um ein Ausfallen der Harnsäure zu erklären; denn das Lösungsvermögen des Blutserums für Harnsäure ist ungemein viel größer — sowohl beim Gesunden wie beim Gichtkranken." Das wäre ganz richtig, wenn es sich in der Tat um Harnsäure handelte; bei Natriumurat jedoch ist das Blut bei einem Gehalt von 30 bis 80 mg bereits übersättigt. Und es handelt sich

zweifellos um Urate: Die Analyse zweier Tophi ergab nach Ebstein und Sprague[1]):

	1	2
Harnsäure	59,7	61,27
Gewebe	27,88	26,45
Na_2O	9,3	12,28
K_2O	2,95	—
CaO	0,17	—
MgO, Fe, P_2O_5, S .	Spuren	unwägbar

Zur Bildung von Mononatriumurat aus 59,7 g Harnsäure wären 11,0 g Na_2O, aus 61,27 g Harnsäure 11,3 g Na_2O erforderlich. Tophus 2 besteht somit lediglich aus Natriumurat, Tophus 1 in der Hauptmasse aus Natriumurat nebst etwas Kaliumurat; der Rest der anorganischen Basen dürfte aus den Gewebebestandteilen entstammen.

Die Analyse eines Gichtknotens durch Herm. Matthes und E. Ackermann[2]) erweist ebenfalls einen Gehalt von Natriumurat.

Wir haben auf Seite 191 gesehen, daß Harnsäure in Serum überfüllte Lösungen zu bilden vermag, aus denen sich binnen 24 Stunden fast die Hälfte der Harnsäure in krystallinischer Form wieder ausscheiden kann, wenn die Möglichkeit für die Bildung von Keimen gegeben ist (vgl. S. 193). Stellen wir uns irgendwelche chemische Prozesse vor, die aus der Harnsäure ein Mononatriumurat bilden, so ist die Vorbedingung für die Bildung krystallinischer Ausscheidungen gegeben. Mononatriumurat selbst vermag, wenn auch nur in ganz geringem Maße, eine überfüllte Lösung zu bilden, der binnen 24 Stunden unter analogen Bedingungen geringe Ausscheidungen folgen. Schließlich ist auch noch an die Untersuchungen von Gudzent zu denken, wonach sich aus dem leichter löslichen unbeständigen Urat das schwerer lösliche beständige Urat bildet.

Wir sehen, es liegen eine ganze Reihe von Möglichkeiten vor, wonach eine Uratübersättigung, sei es auch nur in bezug auf die Gelenke, Niere oder sonstige Organe, auftreten kann. Damit wäre aber bei der Geschlossenheit des Gefäßsystems noch kein Grund zum Ausfallen gegeben, wie unsere Versuche S. 191 beweisen. Es wäre vielmehr reichlich Zeit

---

[1]) Virchows Archiv 125, 207.

[2]) Pharmazeut. Centralh. 50, 214/15.

vorhanden, daß sich die Harnsäure bzw. die Urate, sei es durch Ausscheidung im Harn, sei es durch Umwandlung in Harnstoff bzw. Ammoniak aus dem Kreislauf entfernt. Erst wenn Keime vorhanden sind in Form von Uratablagerungen an den Gelenken, der Niere usw., so werden diese zu einer Ausfällung, also zu einer Retention der Urate im Organismus, zu einem Gichtanfall Veranlassung geben. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Angaben von Noorden[1]), daß bei purinhaltiger Nahrung in der zeitlichen Nachbarschaft von Gichtparoxysmen die Harnsäureausscheidung besonders stark verlangsamt und herabgesetzt ist. Diese unsere Auffassung unterscheidet sich wesentlich von der von Trenkner[2]), der biochemische Veränderungen im Blutserum voraussetzt, Veränderungen, die unsers Erachtens durch nichts bewiesen und für die Erklärung überflüssig sind. — Wie die ersten Keime im Organismus zustande kamen, dafür bieten unsere Versuche keinen Anhalt; das ist ebenso schwer festzustellen wie die Frage, die dem Chemiker fast täglich auftaucht, warum in einer Lösung, die durch kein Mittel zur Krystallisation zu bringen ist, nun plötzlich eines Tages Krystalle auftreten.

Eine Wiederauflösung dieser Ablagerungen wird, selbst unter günstigen Bedingungen, nur sehr langsam von statten gehen, da die Löslichkeit in krystallisiertem Zustande nach bekannten physikalischen Gesetzen eine geringere ist als in statu nascendi oder in der vielleicht kolloiden Lösung des Überfüllungszustandes. Eine Ergänzung in dieser Richtung bietet folgender Versuch: Den aus überfülltem Harnsäureserum ausgefallenen Niederschlag kann man durch Schütteln bei 37° nicht mehr in dem nun gefüllten Serum in Lösung bringen; er löst sich auch nur sehr langsam in frischem Serum. Wohl aber vermag jenes mit Harnsäure gefüllte Serum mit käuflicher Harnsäure wieder sich zu überfüllen und diese binnen 24 Stunden wieder zur Ausscheidung zu bringen.

Da Harnsäure in Wasser schwerer löslich ist als in Serum, so könnte man a priori annehmen, daß eine Verdünnung von harnsäuregesättigtem Serum mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung zu einer Harnsäureabscheidung führt:

---

[1]) Handb. d. Pathol. d. Stoffw. von C. v. Noorden 2, 158.

[2]) l. c.

das Gegenteil ist der Fall. Man kann laut Tabelle II auf das 40fache verdünnen, ohne daß eine Ausfällung erfolgt.

Analog liegen die Verhältnisse für Natriumurat: auch hier wirkt Wasserverdünnung der Uratausscheidung entgegen (vgl. Tabelle III). Diese Versuche bestätigen somit experimentell die Indication von Trinkkuren bei Gicht im allgemeinen. Auf die speziellen Mineralwässer kommen wir später noch zurück.

Fügt man zu Harnsäure in Wasser Natronlauge, so bildet sich das leichter lösliche Mononatriumurat oder, stellen wir uns die Sache etwas anders vor: nehmen wir an, es bilde sich in einer wässerigen Lösung Harnsäure in solcher Menge, daß eine Ausscheidung erfolgen müßte, so könnten wir durch Zusatz von NaOH die Ausscheidung verhindern. Nach dem, was wir von der Schwerlöslichkeit des Mononatriumurates in Serum wissen, könnte man a priori annehmen, daß Zusatz von Natronlauge zu einer gefüllten Harnsäurelösung in Serum das Ausfallen von Harnsäure in Form von Urat begünstigen müsse. Das ist aber keineswegs der Fall; gerade das Gegenteil tritt ein. Nach Tabelle IV wird durch NaOH das Ausfallen von Harnsäure gehemmt (ebenso wie das von Natriumurat, siehe Tabelle V). Hier sehen wir von neuem, wie wenig alle Beobachtungen an wässerigen Lösungen auf Serumlösungen übertragbar sind. Offenbar bildet sich in obigem Fall gar kein Natriumurat, sondern das NaOH tritt in Beziehung zum Serumeiweiß. — Merkwürdigerweise hat der Zusatz einer Säure (HCl), vergleiche Tabelle IV und Tabelle V, den gleichen Effekt, d. h. die Löslichkeit der Harnsäure, in geringem Maße auch des Mononatriumurat in Serum, wird begünstigt.

So interessant diese Tatsachen auch theoretisch sind, praktisch ist ihre Bedeutung noch fraglich, da die wenigen Untersuchungen in dieser Richtung (Benedict, Landau) noch nicht erkennen lassen, ob es möglich ist, die Alkalität des Blutes in solchen Fällen therapeutisch ernstlich zu beeinflussen.

Vergleichen wir unsere Ergebnisse mit den bei der Gichttherapie üblichen Trinkkuren, so erhellt bereits aus dem S. 199 Gesagten, daß die Zufuhr von Wasser das Ausfallen der Harnsäure hemmt, oder anders ausgedrückt, ihre Lösung be-

günstigt. Von den in Betracht kommenden Mineralwässern müssen die mit starkem Na-Gehalt am wenigsten günstig wirken. Eine Beeinflußbarkeit des OH- oder H-Ionengehaltes des Blutes, oder, wenn man an die Titrierbarkeit denkt, der „Alkalität" des Blutes, ist ja fraglich. Wenn man somit dem Organismus „alkalische Mineralwässer" zuführt, mit dem Hintergedanken, durch Erhöhung der Blutalkalität die Harnsäure zu lösen, so ist der Erfolg von theoretischem Gesichtspunkt recht zweifelhaft.

Als „harnsäurelösend" kämen nur in Betracht Kalium-, Lithium- und Magnesiumverbindungen. Wie wenig die Löslichkeitsverhältnisse in Wasser für die Vorgänge im Organismus beweisend sind, erhellt aus dem Vergleich von K, Li und Mg. Die Lithiumsalze gelten als die besten Harnsäurelöser, in Wahrheit werden sie aber bei Gegenwert von Serum durch Kalium- und Magnesiumsalze übertroffen; eine Ausnahme macht nur Lithiumchlorid gegen Natriumurat. Die geringen Mengen Lithium, welche in den Mineralwässern vorkommen, können auf Grund des Obigen als Lösungsmittel gar nicht in Betracht kommen.[1]) Baden-Baden hat z. B. im Liter einen Gehalt von 0,0096 g Lithiumion = 1,37 Millimol, Kreuznach 0,011 g = 1,54 Millimol, Münster a. Stein 0,005 g = 0,72 Millimol, Nauheim (Friedrich-Wilhelm-Sprudel) 0,01 g = 1,47 Millimol, Salzschlirf 0,052 g = 7,3 Millimol im Mineralwasser (nicht im Organismus, wo es doch noch einmal um das ca. 50fache verdünnt werden dürfte!!), während im Serum sich erst bei einem Gehalt von ca. 100 Millimol ein Einfluß bemerkbar zu machen beginnt. Man kann ja daran denken, daß Lithium gar nicht als Harnsäurelösungsmittel wirkt, sondern den Purinstoffwechsel günstig beeinflußt! Demgegenüber möchten wir darauf aufmerksam machen, daß ursprünglich die lithiumhaltigen Mineralwässer mit Rücksicht auf die harnsäurelösende Wirkung von Lithiumsalzen in Aufnahme kamen.

In der Gichttherapie ist schon lange die vegetarische Diät gebräuchlich. Man denkt dabei allerdings hauptsächlich durch

---

[1]) Wir entnehmen die Zahlen dem „Deutschen Bäderbuch" des Kaiserl. Gesundheitsamtes. Die dort teils auf 6 Dezimalen wiedergegebenen Zahlen haben wir abgerundet.

Enthaltung von Fleisch die Purinzufuhr zu unterbinden. Abgesehen davon und von einem Punkt, auf den wir später kommen werden, liegt aber unsres Erachtens der Hauptwert der vegetarischen Diät in der Zufuhr von Kalium- und Magnesiumsalzen. Wie wir vorher sahen, ist Kalium und Magnesium ein hervorragendes Mittel, um die Harnsäure bzw. Uratausscheidung zu behindern und eine möglichst reiche Zufuhr von Kalium- und Magnesiumsalzen muß in dieser Hinsicht günstig auf den Gichtiker wirken. Die Natur hat aber in der Pflanzenkost eine geradezu ideale Nahrung für den Gichtiker geschaffen, indem sie eine reiche Auswahl von Nahrungsmitteln bietet, die bei relativer Natriumarmut in Fülle Kalium- und Magnesiumsalze zuführt. Neben der Kartoffel mit ca. 60% K_2O und ca. 5% MgO bei nur ca. 3% Na_2O, die verschiedenen Getreidemehle mit 25 bis 38% K_2O, 7 bis 14% MgO bei nur 2 bis 6% Na_2O, und vor allen die Gemüse und Obstarten.[1])

Während Kalisalze intravenös und subcutan injiziert erhebliche Giftwirkung, insbesondere auf das Herz zeigen, ist uns bei oraler Aufnahme nichts von derartigen Wirkungen bekannt. Es wäre somit zu untersuchen, inwieweit sich das zum Salzen der Speisen verwendete Kochsalz beim Gichtiker durch Chlorkalium ersetzen ließe.

Wir möchten im Zusammenhang hiermit auf eine Arbeit von Soetbeer[2]) hinweisen, in welcher der Harn eines Gichtikers mit dem zweier Kontrollpersonen verglichen wird. Den größten Unterschied findet Soetbeer beim Vergleich der Harnsäure und der Kaliummengen.

Wir geben hier das Protokoll wieder:

	Kontrolle		Gicht		Kontrolle	
	v. H.	v. H.	W.	W.	A.	A.
K	4,140	4,058	2,685	1,887	4,692	4,063

Die Kaliausscheidung ist bei diesem Gichtiker stark vermindert. Eine Deutung ist natürlich ganz ausgeschlossen, denn wir können nicht wissen, ob nicht eine vermehrte K-Auscheidung

[1]) Diese Daten sind (abgerundet) dem „Mineralstoffwechsel" von Albu-Neuberg, Berlin 1906, entnommen.

[2]) Ein Stoffwechselversuch bei Gicht. Ztschr. f. physiol. Chem. 40, 55 bis 61.

durch den Kot erfolgte, oder ob es sich um eine Kali-Retention des Organismus gewissermaßen als Abwehrmaßregel handelt. Jedenfalls sehen wir hier einen ganz abnormen Kalistoffwechsel in Zusammenhang mit Gicht, und es wäre von großem Interesse, das Augenmerk auf derartige Befunde (auch auf den Magnesiumstoffwechsel) zu lenken.

Auch an eine reichlichere Zufuhr von Magnesiumsalzen wäre zu denken. Man pflegt ja den Obstipationen der Gichtiker durch Purgantia entgegen zu wirken, zumal diese auch nach Kionka[1]) durch ihre gallentreibende Wirkung die Gicht günstig beeinflussen. Bei den Trinkkuren der Gichtiker wird seitens des ordinierenden Arztes sicher auch an die purgierende Wirkung des Magnesiumsulfats gedacht. Es sei ferner darauf hingewiesen, daß einige der für Gichtiker beliebten Mineralwässer, wie Fachingen, Neuenahr, Vichy, erheblichen Magnesiumgehalt aufweisen. Vielleicht liegt ein bemerkenswerter Teil der günstigen Wirkung in dem Eintritt von Magnesiumsalzen in den Organismus.

Auf Grund unserer Ergebnisse wäre solchen Mineralwässern der Vorzug zu geben, die möglichst reich an Magnesium, aber arm an Natriumsalzen (Kochsalz, Glaubersalz usw.) sind, auch mäßige Gaben von Magnesiumchlorid wären vielleicht geboten.

Auf die Beschränkung der Natriumzufuhr haben wir im vorigen bereits hingewiesen. Wir haben aber unter unseren Stoffen noch ein Kation, welches im höchsten Grade die Harnsäureausscheidung begünstigt, während es bei der Natriumuratausscheidung von wechselnder Bedeutung ist: NH_4. Ammonium ist das Endprodukt des Eiweißstoffwechsels und bildet sich ständig im Organismus. Man könnte deshalb darauf bedacht sein, beim Gichtiker eine eiweißarme, auf das Eiweißminimum beschränkte Diät zu empfehlen und den Calorienbedarf durch Kohlenhydrate und Fette (soweit angezeigt) zu ergänzen. Auch dies wird am besten durch vegetarische Diät zu erreichen sein. Wir sehen somit, daß die Fleischdiät nicht nur auf die purinarmen Speisen zu beschränken sein dürfte, sondern daß wegen der Bildung von Ammoniumsalzen auch die Zufuhr von Eiweiß, soweit sie das Eiweißminimum überschreitet, ungünstig wirken könnte, trotzdem der Eiweißgehalt der Nahrung

---

[1]) Ztschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 2, 16.

für die Größe der Harnsäureausscheidung im Harn als einflußlos feststeht.[1])

Radiumemanation.

Unter den verschiedenartigen Kuren, zu denen radioaktive Wässer empfohlen werden, haben zweifellos diejenigen bei gichtigen und rheumatischen Leiden die häufigsten günstigen Bestätigungen gefunden. Wir verweisen auf die Veröffentlichungen von Löwenthal[2]), Laqueur[3]), Strasser und Selka[4]), Sommer[5]), Fuerstenberg u. a.

Es war deshalb für uns von großem Interesse zu prüfen, wie Radiumemanation auf harnsäure- und natriumurathaltiges Serum wirkt.

Die Radiogengesellschaft[6]) stellte uns zu diesem Zweck liebenswürdigerweise zwei Radiogenkerzen zur Verfügung und fertigte uns zu Kontrollzwecken zwei gleiche Kerzen an, die an Stelle der radioaktiven mit einer indifferenten Substanz gefüllt waren. Die Radiogenkerzen zeigten laut Eichschein

1. Kerze 7590,8 Voltverlust pro Stunde,
2. „ 7397,75 „ „ „

also rund 7000 Einheiten in 10 ccm unter der Voraussetzung, daß sie sich in 2 l Wasser ca. 1 Woche lang befinden. Da sie sich jedoch in rund 200 ccm Serum befanden, so enthielten 10 ccm rund 70000 Einheiten.

Nach Abschluß sämtlicher Versuche wurden die beiden Kerzen nochmals geeicht und zeigten laut Eichschein:

1. Kerze 7834,6 Voltverlust pro Stunde,
2. „ 7696,8 „ „ „

Eine Abnahme der Radioaktivität hatte somit nicht stattgefunden.

Die Versuche stellten wir auf zwei verschiedene Arten an:

1. Eine größere Menge Ochsenblutserum wurde geteilt, die eine Hälfte wurde im Eisschrank für die späteren Versuche

---

[1]) Vgl. Siven, Skandin. Arch. f. Physiol. 11, 122, 1901 und Burian und Schur, Pflügers Arch. 80, 337 und 87. 257.

[2]) Berl. klin. Wochenschr. 1906, Nr. 46; 1907, Nr. 35.

[3]) Ebenda, 1907, Nr. 23.

[4]) Medizin. Klinik 1908, Nr. 28.

[5]) Emanation u. Emanationstherapie, München 1908.

[6]) Radiogengesellschaft G. m. b. H., Charlottenburg.

reserviert, mit der anderen Hälfte ein luftdicht verschließbares Glas voll angefüllt, mit einer sterilen Radiogenkerze beschickt und luftdicht verschlossen im Eisschrank aufbewahrt, so daß keine Luft über dem Serum sich befand. Nach 7 bis 8 Tagen konnte man annehmen, daß das Serum mit Emanation gesättigt war. Nun wurden Kontrollserum und emanationshaltiges Serum in der früher geschilderten Weise mit Harnsäure überfüllt, bei 37° filtriert und in je ein Glasgefäß gebracht, an dessen Deckel je eine Kerze (Radiogenkerze und Kontrollkerze) mit Paraffin befestigt war; alles wurde dann im Brutschrank aufbewahrt. Alle Maßnahmen müssen rasch und steril vorgenommen werden: das Serum verliert schnell Emanation an der Luft, wird also unwirksam, und Verunreinigungen von Serum, die nur das geringste Faulen zur Folge haben, bewirken Ausfallen von Harnsäure bzw. Uraten zu einer Zeit, wo reines Serum die Harnsäure noch vollkommen in Lösung hält. Es ist ferner noch folgende Schwierigkeit bei dem Versuch zu umgehen: Wie bereits S. 193 gezeigt, scheidet sich aus einem vollen Glas mit Harnsäure übersättigten inaktivierten Serums unter Umständen keine Harnsäure aus, wenn nicht ein Luftraum mit größerer Oberfläche über der Flüssigkeit ist; auf der anderen Seite gibt emanationhaltiges Serum seine Emanation an die Luft ab, wenn ein größerer Luftraum über dem Serum steht, und der Versuch ist vergeblich. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, ließen wir bei einem Gefäß, das ca. 60 ccm Serum faßt, ca. 2 ccm Luftraum über dem Serum.

Aus den verschiedenen Protokollen, die bei exakter Ausführung ziemlich übereinstimmten, sei folgendes angeführt:

		Emanationsserum	Kontrolle
nach	24 Stunden	0, klar	einzelne Kryställchen klar
„	2×24 „	0, klar	+++
„	3×24 „	unbedeutende Ausscheidung	+++
„	4×24 „	trüb, mäßige Ausscheidung, besonders am Luftrand	+++
„	5×24 „	trüb, Ausscheidung jedoch bei weitem nicht so stark wie in Kontrolle	+++

Es ergibt sich hieraus, daß die Emanation die Harnsäureausscheidung bei inaktiviertem Serum entschieden verzögert.

Es ist dies um so bemerkenswerter, als dies trotz der Bildung von Keimen erfolgt war.

Einen Teil des emanationgefüllten und harnsäure-überfüllten Serums nebst Kontrollen brachten wir in Fläschchen, teils ganz voll, teils nur zur Hälfte, und stellten sie verschlossen in den Brutschrank. Bei den halbgefüllten Gefäßen zeigte sich kein Unterschied zwischen emanationhaltigem und Kontrollserum, offenbar konnte zu viel Emanation in die Luft entweichen. Von den gefüllten Gefäßen seien folgende Protokolle angeführt:

	Emanationsserum	Kontrolle
nach 24 Stunden	0	einzelne Kryställchen
„ 2×24 „	0	+++
„ 3×24 „	0	+++
„ 4×24 „	+++	+++

Also auch bei diesen Versuchen, bei denen keine Radiogenkerze weitere Emanation zuführte, verzögerte sich die Harnsäureausscheidung gegenüber der Kontrolle. Es sei noch erwähnt, daß bei Flaschen mit gewöhnlichem Korkverschluß die Harnsäure einen Tag früher ausfiel als bei solchen mit Paraffinverschluß.

2. Eine andere Versuchsanordnung bestand darin, daß wir inaktiviertes Serum mit Harnsäure überfüllten, es in zwei Gläsern verteilten, in das eine Glas eine Radiogenkerze stellten, in das andere zur Kontrolle eine indifferente Kerze, und beide Gläser im Brutschrank aufbewahrten. Auch hier zeigte sich zweifellos eine Verzögerung im Ausfallen der Harnsäure. Aus unseren zahlreichen wiederholten Versuchen sei nur eines der Protokolle hier wiedergegeben:

	Harnsäureausscheidung	
Glas mit Serum halbgefüllt (Kerze überdeckt)	aus Serum mit Radiogenkerze	aus Serum mit indifferenter Kerze
nach 24 Stunden	0	+
„ 48 „	0 bis +	++
„ 3×24 „	+	+++

Aus beiden Versuchsanordnungen ergibt sich, daß Emanation auf die Harnsäureausscheidung verzögernd einwirkt. Bei Versuchsanordnung 1 konnte man im Zweifel sein, ob nicht emanationhaltiges Serum weniger Harnsäure löse als normales, und daß dadurch die verzögerte und verminderte Harnsäure-

abscheidung bedingt sei. Dieser Einwand wird durch Versuchsanordnung 2 behoben: bei dieser Versuchsanordnung hätte, wäre der Einwand richtig, das Serum mit Radiogenkerze mehr Harnsäure ausscheiden müssen als die Kontrolle: es trat jedoch gerade das Gegenteil ein.

Es sei betont, daß diese klaren Ergebnisse nur bei inaktiviertem Serum zutage treten. Bei frischem Serum war manchmal ein Unterschied, manchmal auch nicht.

Während wir bei harnsäurehaltigem Serum eine zweifellose Einwirkung der Emanation beobachteten, war es uns nicht möglich, Unterschiede in dem Ausfallen bei natriumurathaltigem Serum durch Emanation zu erkennen.

Zusammenfassung.

1. Es wurde nachgewiesen, daß bei 37° die Löslichkeit von Harnsäure in inaktiviertem Rinderserum (Überfüllung) 1:1100, (Füllung) 1:1925 beträgt.

2. Es wurde nachgewiesen, daß das Lösungsvermögen von inaktiviertem Rinderblutserum bei 37° für Mononatriumurat = 1:40000 ist.

Während somit in Wasser sich Harnsäure schwerer als Mononatriumurat löst, ist in Serum Mononatriumurat weit schwerer löslich als Harnsäure.

3. Verdünnung mit Wasser und physiologischer Kochsalzlösung hemmt das Ausfallen von Harnsäure und Mononatriumurat aus Serum.

4. OH-Ionen (NaOH) und H-Ionen (HCl) hemmen das Ausfallen von Harnsäure und Mononatriumurat aus Serum.

5. Für das Ausfallen von Harnsäure und Mononatriumurat aus Serum durch Neutralsalze sind vor allem die Kationen maßgebend. Kalium, Lithium und Magnesium wirken hemmend, Natrium stets und Ammonium in den meisten Fällen fördernd auf das Ausfallen von Harnsäure und Mononatriumurat.

6. Aus den im Text angeführten Zahlen zeigt sich, daß das Blut der Gichtiker, im Gegensatz zu den bisherigen An-

nahmen, oft mit Uraten übersättigt ist, und es ergeben sich Anhaltspunkte für die Ausscheidungsbedingungen der Urate.

7. Für die Gichttherapie erweisen sich Lithiumwässer, sofern der günstige Erfolg auf die lösende Wirkung der Lithiumsalze zurückgeführt werden soll, wegen des geringen Li-Gehaltes dieser Wässer als belanglos. Trinkkuren, insbesondere kalium- und magnesiumhaltige Wässer dürften danach günstig, natriumhaltige ungünstig wirken, sofern es erlaubt ist, die Ergebnisse dieser Untersuchung auf die Therapie zu übertragen. Unter diesem Vorbehalt ist eine vegetarische Diät mit ihrer reichen Zufuhr von Kalium- und Magnesiumsalzen der Fleischkost vorzuziehen, die, selbst bei purinarmer Kost, mehr ungünstig wirkende Ammoniumsalze bildet.

8. Radium-Emanation hemmt das Ausfallen von Harnsäure aus Serum, doch war ein Einfluß auf das Ausfallen von Mononatriumurat nicht zu konstatieren.

Über die Zuckerbildung in der künstlich durchbluteten Leber diabetischer Tiere.

Von

Leone Lattes, Turin.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1909.)

Bei der künstlichen Durchströmung der isolierten, lebensfrischen Hundeleber mit verdünntem Blute, dem Wittepepton oder Serumglobulin hinzugefügt war, konnte Fr. Kraus[1]) nur dann eine wesentliche Vermehrung des Zuckers in der Durchströmungsflüssigkeit nachweisen, wenn die zum Versuche benutzte Leber glykogenhaltig war.

Fr. Kraus ist daher geneigt, eine in der künstlich durchbluteten Leber beobachtete Zuckerbildung ausschließlich durch Spaltung von Leberglykogen zu erklären.

Zu anderen Ergebnissen gelangte Embden[2]), der seine Durchblutungsversuche an völlig glykogenfreien Lebern vornahm. Die Glykogenfreiheit wurde nach einer vorangehenden Hungerperiode durch angestrengte Muskelarbeit oder durch Strychninkrämpfe erzielt. Die Durchströmung wurde in einigen Fällen mit unverdünntem Hundeblut, in der Mehrzahl der Versuche mit Rinderblut ausgeführt.

Embden stellte in allen Versuchen eine sehr erhebliche Steigerung des Blutzuckers während der Durchblutung fest.

---

1) Fr. Kraus, Über Zuckerbildung in der Leber bei Durchblutungsversuchen. Pflügers Archiv 90, 630. 1902. — Derselbe, II. Mitteilung, daselbst 98, 452, 1903.

2) G. Embden, Über Zuckerbildung bei künstlicher Durchblutung der glykogenfreien Leber, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 44, 1904.

Diese Steigerung des Zuckergehalts trat auch dann ein, wenn das Blut vor Beginn des Versuchs durch Zusatz von Traubenzucker abnorm zuckerreich gemacht worden war.

Nach etwas mehr als einer Stunde hörte die Zuckerbildung auf, konnte jedoch durch Zusatz von frischem Blut wieder neu angefacht werden.

In diesem zweiten Blutquantum stieg der Zuckergehalt auf ähnliche Werte, wie bei der Durchströmung mit der ersten Blutportion.

Embden hält es auf Grund dieses Verhaltens für wahrscheinlich, daß der bei der Durchblutung der Leber neugebildete Zucker aus einer Vorstufe im Blute entsteht. Jedoch konnte er zeigen, daß Rinderblut, in dem die Zuckerbildung bei der Durchblutung einer ersten glykogenfreien Leber zum Abschluß gekommen ist, unter Umständen bei der Durchströmung einer zweiten glykogenfreien Leber noch einen Zuckerzuwachs erfahren kann, wodurch die Annahme nahegelegt wird, daß ein Teil des neugebildeten Zuckers auch der Leber entstammt.

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung konnten Embden und ich[1]) zeigen, daß die Leber von Hunden, die entweder durch Totalexstirpation des Pankreas oder durch Vergiftung mit Phloridzin diabetisch gemacht worden sind, bei der künstlichen Durchströmung mit normalem Rinderblut weit größere Mengen Acetessigsäure entstehen läßt, als die normale Leber unter gleichen Versuchsbedingungen.

Da die Zuckerbildung im normalen wie auch im pathologischen Organismus — ganz ähnlich wie die Acetessigsäurebildung — ein vorwiegend oder ausschließlich in der Leber sich abspielender Vorgang zu sein scheint, lag es nunmehr nahe, zu untersuchen, ob ähnlich wie die Acetessigsäurebildung auch die Zuckerbildung bei der künstlichen Durchblutung der Leber diabetischer Tiere eine Steigerung erfährt.

Ich habe daher gelegentlich derselben Versuche, welche Embden und mir zum Studium der Acetessigsäurebildung in der Leber diabetischer Hunde dienten, auch Bestimmungen des Zuckers im Blute vor und nach der Durchblutung ausgeführt.

---

[1]) G. Embden und L. Lattes, Beiträge z. chem. Physiol. und Pathol. 11, 327.

Dementsprechend wurden meine Versuche teils an der Leber phloridzinvergifteter, teils an jener pankreasloser Hunde vorgenommen. In beiden Fällen war die Leber der nach der Pankreasexstirpation bzw. nach Beginn der Phloridzinvergiftung hungernden Hunde als völlig oder nahezu glykogenfrei anzusehen.

Ich habe mich hiervon des öfteren durch die Untersuchung eines vor der Durchblutung abgebundenen Kontrolllappens auf Glykogen überzeugt. Ich bediente mich hierbei der Pflügerschen Methode.

Nach Zusatz des Alkohols zur Glykogenfällung erhielt ich nur geringfügige Niederschläge, die bei der vorschriftsmäßigen Weiterbehandlung sich als praktisch glykogenfrei erwiesen.

Bezüglich der Technik der Durchblutung verweise ich ganz auf die eben erwähnte Arbeit von Embden und mir. Die Enteiweißung des Blutes erfolgte nach Schenck mit Salzsäure und Sublimat, die Titration nach Knapp in der früher von Embden[1]) geschilderten Weise.

Die Ergebnisse meiner Versuche sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

1. Nr. des Versuchs	2. Versuchstier	3. Gewicht der Leber vor der Durchblutung ohne Zwerchfell und Kanülen g	4. Dauer der Durchblutung Min.	5. Zucker im Blute vor der Durchblutung (Blut A) %	6. Zucker im Blute nach der Durchblutung (Blut B) %	7. Zuckergehalt in Blut B auf den Zuckergehalt in Blut A = 100 bezogen
1	Pankreaslose Hündin, 3 Tage nach der Pankreasexstirpation .	etwa 270	60	0,036	0,118	328
2	Pankreaslose Hündin, 3 Tage nach der Pankreasexstirpation .		60	0,039	0,076	195
3	Pankreasloser Hund, 5 Tage nach der Pankreasexstirpation .	etwa 140	60	0,051	0,102	200
4	4 Tage mit Phloridzin vergifteter Hund .	etwa 150	60	0,042	0,091	216
5	6 Tage mit Phloridzin vergifteter Hund .		60	0,044	0,135	306
6	7 Tage mit Phloridzin vergifteter Hund .		45	0,057	0,128	224

[1]) G. Embden, l. c.

Die Versuchszahlen meiner Tabelle entsprechen jenen der gemeinschaftlich mit Embden veröffentlichten Arbeit.

Man sieht, daß in allen Fällen eine ganz wesentliche Vermehrung des Blutzuckers eingetreten ist. In Kolonne 7 der Tabelle ist der Zuckergehalt des Blutes vor der Durchblutung (Blut A) = 100 gesetzt und darauf der Zuckergehalt des Blutes nach der Durchblutung (Blut B) berechnet. In 2 Fällen (Versuch 2 und 5) steigt der Blutzuckergehalt während der Durchblutung auf mehr als das Dreifache des Ausgangswertes.

Wie verhalten sich nun diese Ergebnisse zu den früher von Embden gewonnenen?

Zur Besprechung dieser Frage teile ich die Resultate einiger mit den meinen unmittelbar vergleichbarer Versuche des eben genannten Autors mit (Kolonne 8 der Tabelle 1 der Embdenschen Arbeit).

Setzt man Zuckergehalt des Blutes vor der Durchblutung auch hier = 100, so war die Blutzuckermenge am Ende der Durchblutung

in Versuch 1 = 259
„ „ 2 = 240
„ „ 3 = 180
„ „ 4 = 219

Ein Vergleich mit den entsprechenden Zahlen meiner Tabelle (Kolonne 7) ergibt, daß der Blutzucker in den Versuchen Embdens während der Durchblutung um sehr ähnliche Beträge stieg, wie in den meinen.

Nur in den beiden eben genannten Fällen meiner Arbeit (Versuche 2 u. 5 der oben stehenden Tabelle) ist die Vermehrung des Blutzuckers etwas beträchtlicher, als in jenen Versuchen Embdens, die die stärkste Zuckerzunahme aufweisen.

Ein Teil der in den übrigen Tabellen der Embdenschen Arbeit mitgeteilten Versuche zeigt allerdings einen wesentlich geringeren Zuckerzuwachs.

Es ist aber zu bedenken, daß die Untersuchungen Embdens an der völlig glykogenfreien Leber angestellt wurden, während in meinen Versuchen möglicherweise doch noch Spuren Glykogen vorhanden waren.

Das wesentlichste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist demnach, daß die Zuckerbildung in der künstlich

durchbluteten Leber pankreasloser oder phloridzinvergifteter Hunde keine merklich höheren Beträge erreicht, als in dem durch Arbeit oder Strychninkrämpfe von Glokogen befreiten Organ.[1])

Läßt sich also die zu vermehrter Acetessigsäureausscheidung im diabetischen Organismus führende biologische Leberveränderung noch am isolierten, künstlich durchbluteten Organ nachweisen, so konnten unter gleichen Versuchsbedingungen Anhaltspunkte für eine vermehrte Zuckerbildung in der diabetischen Leber nicht gewonnen werden.

Diese negativen experimentellen Ergebnisse schließen natürlich keineswegs aus, daß trotzdem die Leber im diabetischen Organismus der Sitz einer abnorm reichlichen Zuckerbildung ist.

---

[1]) Die Angaben Zülzers (Berl. klin. Wochenschr. 1907, 474) über vermehrte Zuckerbildung in der künstlich durchbluteten Leber pankreasloser Hunde stehen hierzu in einstweilen ungeklärtem Widerspruch.

Über die Verdauung der Fette im tierischen Organismus.

Von

S. J. Levites.

(Aus dem patholog. Laboratorium am Kaiserl. Institut für experimentelle Medizin zu St. Petersburg.)

(Eingegangen am 11. Juli 1909.)

Die vorliegende Untersuchung schließt sich meinen früheren Versuchen über dieses Thema an.[1]) Seinerzeit wurde festgestellt, daß die Fette im Magen nur eine ganz geringe Verseifung erleiden, solange die Duodenalsäfte durch die antiperistaltische Bewegung nicht in den Magen gelangen. Ist dieses jedoch der Fall, so kann eine weitgehende Verseifung der Fette schon im Magen stattfinden, wie der folgende Versuch mit Rinderfett bestätigt.[2])

Dargereichtes Fett		Dauer der Verdauung in Stdn. Rinderfett	Zurückgewonnenes Fett	
Menge in g	Säurezahl		Menge in g resp. %	Säurezahl
100	0,40	1	99,1	0,46
100	0,40	2	94,8	0,48
100	0,40	3	93,7	0,48
100	0,37	4	89,0	0,55
100	0,37	5	85,0	0,69
100	0,37	6	65,2	0,82
100	0,37	7	13,3 *)	6,27

*) Reaktion alkalisch.

Schon damals war mir auffällig, daß meine Versuche mit denjenigen von Volhard nicht im Einklange standen; bekanntlich gelang es diesem Forscher, zu beweisen, daß im Magen des

[1]) Vgl. Zeitschr. f. physiol. Chem. 49, 53 u. 57.

[2]) l. c. 49.

Menschen das Eidotterfett eine beträchtliche Spaltung von 30 bis 40% erreichen kann. Der Befund von Volhard wurde später von manchen Forschern bestätigt. Fromme[1]) zeigte, daß dem Fundusextrakte eine deutlich wirkende Fettverseifung zukommt, nicht aber dem Extrakte aus dem Pylorusteile; ebenso besitzt nach Pawlow (Lakeur)[2]) der Magensaft eines Hundes mit einem kleinen Magen eine fettspaltende Wirkung. Die letzten Unsersuchungen in dieser Richtung sind von London und Wersilowa[3]) angestellt. Auch diese Forscher bestätigten durch Versuche am Magenfistelhunde, bei dem das Zurücktreten der Duodenalsäfte ausgeschlossen war, daß die Fettspaltung des Eidotterfettes unter Umständen bis zu 30% der gesamten Fettsäuren betragen kann.

Jetzt, wo die Versuche Volhards keinem Zweifel mehr unterliegen, war es um so wünschenswerter, eine Erklärung zu finden, warum die Zahlen Volhards von den meinen so weit abweichen. Die nächste Aufgabe war natürlich, zu untersuchen, wie verhält sich das reine Eidotterfett im Magen; nachdem es sich erwiesen hat, daß dieses Fett in seinem Verhalten von dem der übrigen festen Fette abweicht, schien es mir notwendig, in den Kreis meiner Untersuchung auch die flüssigen Fette zu ziehen, um ein möglichst vollständiges Bild über das Verhalten der Fette im Magen zu gewinnen. Volhard wie auch die aufgezählten Forscher haben ihre Versuche mit Eidotterfett ausgeführt, nicht aber mit den reinen, aus dem Dotter isolierten Fette.

Die Versuche wurden an zwei Fistelhunden vorgenommen:

1. Der erste Hund W. mit einer Fistel an der Grenze zwischen dem fundalen und pylorischen Teil des Magens.

2. Der andere Hund M. mit einer Fistel hart am Pylorus; die Fistel war so angebracht, daß das Zurücktreten der Duodenalsäfte in den Magen verhindert war. Beide Hunde sind aus der Serie der Polizeifistelhunde von E. S. London.

Die ersten Versuche wurden mit reinem Eidotterfett und Olivenöl ohne Zugabe anderer Nahrung ausgeführt; da der Hund das Fett nicht freiwillig fressen wollte, so wurde ihm das Fett in die Fistel eingetragen.

---

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 1906.

[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 1906.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 1908.

Nach bestimmten Zeitintervallen wurde die Fistel geöffnet, die Entleerungen gesammelt, aus welchen der Fettgehalt und der Grad der Fettspaltung bestimmt wurde. Die Fettspaltung wird durch die Säurezahl, d. h. durch die Anzahl Kubikzentimeter $^{n}/_{10}$-NaOH, die zur Neutralisation von 1 g Fett verbraucht war, ausgedrückt.

Fettart	Zeit in Stunden	Menge des verabreichten Fettes in g	Reaktion der Entleerungen	Fettgehalt in den Entleerungen		Säurezahl		% der freien Fettsäuren[1])
				in g	in %	d. verabreichten Fettes	aus den Entleerungen	
Eidotterfett	1	10	alkalisch	1,22	11,20	0,14	11,56	32,03
„	2	10	„	0,23	2,30	„	33,04	93,11
„	2	20	„	6,04	30,20	„	18,70	52,73
„	4	20	„	2,15	10,75	„	21,40	60,35
Olivenöl	2	15	sauer	8,34	56,06	0,80	2,40	4,51
„	4	15	„	3,13	20,20	„	2,36	4,40

Aus diesen Versuchen läßt sicht leicht erkennen, wie verschieden das Eidotterfett von Olivenöl sich im Magen verhält. Nach dem Verabreichen von 10 g Eidotterfett im Verlauf von 1 Stunde reagiert der Mageninhalt alkalisch, die Fettverseifung beträgt über 30% freier Fettsäuren auf Ölsäure bezogen. Beim Olivenöl reagiert der Mageninhalt während 4 Stunden nach dem Verabreichen des Fettes noch sauer, die Fettspaltung beträgt kaum 4 bis 5%.

Betreffs Bestimmung der Dauer des Verweilens der Fette im Magen sind die eben angeführten Versuche nicht ganz genau, weil die Menge des verabreichten Fettes bei der Einführung mit der Sonde nicht genau bestimmt werden konnte. Daher wurden einige Versuche mit anderen Fetten bei Zugabe von Brot ausgeführt. Wurde das Brot mit Fett durchtränkt, so fraß der Hund gern. Die Brotmenge betrug gewöhnlich 30 bis 50 g.

Fettart	Zeit in Stunden	Menge des verabreichten Fettes in g	Reaktion der Entleerungen	Fettgehalt in den Entleerungen		Säurezahl		% der freien Fettsäuren
				in g	in %	d. verabreichten Fettes	aus den Entleerungen	
Mohnöl	3	25	sauer	10,40	41,60	0,7	1,82	3,15
Mandelöl	2	25	„	16,28	65,12	—	1,00	—
Triolein	2	20	„	7,16	35,80	—	0,56	—

Auch bei diesen Versuchen bleiben die Verhältnisse dieselben, wie wir sie beim Olivenöl beobachtet haben. Der Mageninhalt reagiert sauer; die Fettverseifung ist immer gering. Der Hauptunterschied zwischen den Eidotter- und den anderen Fetten liegt also darin, daß ersteres rasch eine

[1]) Auf freie Ölsäure bezogen.

starke antiperistaltische Bewegung hervorruft, und dadurch wird die weitgehende Spaltung des Eidotterfettes verursacht, während sie bei den anderen Fetten sehr langsam vor sich geht.

Führt man den Versuch so aus, daß das Eintreten der Duodenalsäfte in den Magen verhindert wird, wie die Versuche mit dem Hunde M. zeigen, so verhält sich dann auch das Eidotterfett ganz gleich den übrigen Fetten, es wird nur in ganz geringem Maße verseift, wie die Versuche mit dem Hunde M. lehren.

Versuch 1. Dem Hund wurden 20 g Eidotterfett mit 35 g Brot verabreicht; nach $3^1/_2$ Stunden wurde der Versuch abgeschlossen; das aus den Entleerungen extrahierte Fett zeigte eine Säurezahl von 0,7; hiervon ist 0,14 die Säurezahl des Fettes vor dem Versuche, es beträgt also die Säurezahl nach dem Verweilen im Magen 0,56.

Versuch 2. Derselbe Hund bekam 10 g Triolein und 25 g Brot. Dauer des Versuches 3 Stunden. Die Säurezahl des Fettes aus den Entleerungen betrug 0,45. Das Eidotterfett, wie wir gesehen haben, macht in dieser Hinsicht gar keine Ausnahme.

Durch diese Versuche wurde unsere vor mehreren Jahren gemachte Beobachtung nochmals bestätigt. Allgemein müssen wir annehmen, daß die Fette mit oder ohne Beimengung anderer Nahrung nur eine ganz geringe Verseifung im Magen erleiden. Unter diesen Bedingungen vermag der Magensaft eine ganz geringe Verseifung zu befördern. Warum aber das Eidotterfett als Eidotter verabreicht im Magen eine tiefgehende Spaltung erleidet und durch welche Faktoren diese Erscheinung verursacht wird, hierüber werden uns künftige Versuche eine Aufklärung geben. Auf ein näheres Eingehen auf die verschiedenen Hypothesen, die in der Fachliteratur ausgesprochen sind, muß man vorläufig verzichten.

Über die Desamidoproteine.

Von

S. J. Levites.

(Aus dem patholog. Laboratorium am Kaiserl. Institut für experimentelle Medizin zu St. Petersburg.)

(Eingegangen am 11. Juli 1909.)

Vor einigen Jahren habe ich eine kurze Abhandlung über die Wirkung der salpetrigen Säure (Alkalinitrit + Essigsäure) auf die Proteine veröffentlicht.[1]) In dieser Abhandlung wurde gezeigt:

1. daß die Schiffsche Erklärung für das Zustandekommen der Biuretreaktion nicht ohne weiteres auf die Proteinstoffe anwendbar ist;

2. daß der sogenannte Amidstickstoff keinen Einfluß auf die Biuretreaktion hat; denn die Biuretreaktion ist auch bei solchen Proteinen mit aller Schärfe nachzuweisen, bei denen der Amidstickstoff gänzlich fehlt;

3. die Desamidoproteine weisen häufiger noch einen größeren Amidstickstoffgehalt auf als das Ausgangsprotein; nur in einzelnen Fällen bleibt der Amidstickstoff unverändert (vgl. weiter unten).

Seit meinem Veröffentlichen der eben zitierten Arbeit widmeten sich dieser Frage mehrere Forscher, von denen Zd. H. Skraup[2]) in erster Linie zu nennen ist. Genannter Forscher hat in Gemeinschaft mit mehreren Mitarbeitern eine große Anzahl von desamidierten Proteinen untersucht und gezeigt, daß bei diesen das Lysin nicht mehr nachzuweisen ist, die desamidierten Proteinstoffe sind also lysinfreie Proteine. Was die übrigen zwei Hexonbasen, Arginin und Histidin anbetrifft,

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 43.

[2]) Monatshefte 1906/07.

so verhalten sich in dieser Beziehung verschiedene Eiweißstoffe wesentlich verschieden: Bei manchen desamidierten Stoffen bleiben die letztgenannten Hexonbasen unverändert, bei anderen ist ihr Gehalt mehr oder weniger vermindert. Von den Monoaminosäuren ist zu sagen, daß ihr Gehalt quantitativ wahrscheinlich unverändert bleibt, mit Ausnahme des Tyrosins, das bei allen Desamidoproteinen fehlt. Es ist zu vermuten, daß die Desamidoproteine auch Oxyaminosäuren (vielleicht auch stickstofffreie Carbonsäuren) enthalten, wie es sich weiter zeigen wird. Fragen wir uns an der Hand der jetzigen Kenntnisse über die desamidierten Proteine, wie erklärt sich der Gang der Reaktion zwischen Protein und Salpetrigesäure, so finden wir vorläufig keine Antwort. Wir wissen nicht, wie weit wir berechtigt sind, die mit Salpetrigesäure behandelten Proteine als desamidierte zu bezeichnen, denn es ist noch nicht bestätigt worden, daß hier tatsächlich eine Desamidierung, im wahren Sinne des Wortes, stattfindet. Ausgehend von dem Standpunkte, daß die Reaktion zwischen Proteinen und Salpetrigesäure nach dem Schema

$$R-NH_2+NO.OH=R-OH+H_2O+2N$$

verläuft, und unter Zugrundelegung, daß diese Reaktion sich nur mit den Diaminosäuren abspielt, von denen das Lysin vor allem in die Reaktion eintritt, so wäre es zu erwarten, daß eine Oxyaminocapronsäure oder Dioxycapronsäure entstehen werde. Dadurch wäre auch erklärt, warum das Lysin in den Desamidoproteinen fehlt. Treves[1]) glaubt, daß bei der Behandlung der Proteine mit Salpetrigesäure, besonders bei niedrigen Temperaturen, diazotierte Produkte entstehen; diese Annahme ist nicht unwahrscheinlich, denn beide Reaktionen schließen sich gar nicht voneinander aus.

Bei der Fortsetzung dieser Arbeit war mein Bestreben, eine Oxyaminosäure aus dem desamidierten Protein zu isolieren. Nach mühevollen Versuchen ist es mir nicht gelungen, eine Oxyaminosäure mit Sicherheit nachzuweisen. Die Arbeit in dieser Richtung wird noch weiter fortgesetzt.

Um jedoch den Verlauf der Reaktion (Protein + Salpetrigesäure) etwas zu erhellen, wurden vergleichende Versuche der

---

[1]) Diese Zeitschr. 1908.

Verteilung des Stickstoffes in den desamidierten Produkten und in den entsprechenden Ausgangsproteinen ausgeführt. Wie sich weiter unten zeigen wird, gibt uns diese Methode einige sichere Fingerzeige über den Verlauf der uns interessierenden Reaktion. Die Untersuchung geschah nach der Methode von Hausmann, unter Berücksichtigung mancher Verbesserungen, die in der letzten Zeit eingeführt waren. Diese Untersuchungsmethode ist keine exakte, aber in meinem Falle, wo es sich um vergleichende Versuche handelt, ist dieselbe durchaus anwendbar und zuverlässig, vorausgesetzt, daß die Bestimmungen jedesmal unter genau gleichen Bedingungen ausgeführt werden. Der Kürze halber werde ich von einer genaueren Beschreibung dieser Methode Abstand nehmen.

Erwähnen möchte ich nur, daß ich für jeden Versuch genau 4 g Substanz verwendete, welche mit der 20fachen Menge konzentrierter Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler hydrolysiert wurde. Der Amidstickstoff wurde durch Destillation mit MgO unter vermindertem Drucke bei 37 bis 38° C bestimmt; der Rückstand filtriert, das Filtrat mit Schwefelsäure bis zu 5% Volumen versetzt und auf 500 ccm ausgefüllt, wovon zu weiterer Analyse 100 cm verbraucht wurden und weiter wie üblich verfahren. (Vgl. Tierfelders Handbuch, S. 520.)

Desamidovitellin.

Als Ausgangsmaterial zur Darstellung des Desamidovitellins diente entfettetes und lecithinfreies Eigelb, ein weißgelbliches Pulver mit 12,86% Stickstoff. Vitellin ist in verdünnten Säuren unlöslich, quillt darin aber stark auf. Verwendung stärkerer Säuren wie Erwärmen über 40° C war für die Darstellung des Desamidovitellins nicht wünschenswert. Wir verfuhren in folgender Weise: 50 g Vitellin wurden in eine Flasche mit 500 cm 10%iger Essigsäure eingetragen und auf der Schüttelmaschine einige Stunden geschüttelt; die auf diese Weise erzielte feine Emulsion wurde in eine geräumige Schale auf dem Wasserbade gebracht und mit 10% $NaNO_2$-Lösung unter starkem Rühren tropfenweise versetzt und das Erwärmen weiter fortgesetzt (nicht über 40° C), bis das starke Schäumen abgenommen hat. Es setzte sich am Boden der Schale ein schön gelber Bodensatz ab; dieser wurde abfiltriert, zunächst mit Wasser, dann mit Alkohol und

Äther gewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet. Von der Biuretreaktion läßt sich nichts Bestimmtes sagen, die Millonsche Reaktion ist sicher negativ. Eine direkte Bestimmung zeigte sicher das Fehlen des Tyrosins in Desamidovitellin.

Verteilung des Stickstoffes.

	Vitellin		Desamidovitellin	
	in °/₀ der Substanz	in °/₀ des Gesamt-N	in °/₀ der Substanz	in °/₀ des Gesamt-N
Ammoniak-N .	0,83	6,17	1,21	8,82
Monoamino-N .	8,34	64,85	7,01	72,92
Diamino-N . .	3,54	37,45	2,11	15,30
Humin aus Differenz . . .	—		0,39	—

Vergleicht man die Zahlen der Stickstoffverteilung im Vitellin und im Desamidovitellin, so wird die starke Abnahme des Diaminostickstoffes gleich auffallend, es ist über 12°/₀ (auf Gesamtstickstoff gerechnet) beim Desamidovitellin geringer, und annähernd um diese Größe hat der Ammoniak und Monoaminostickstoff zugenommen; dieser Erscheinung werden wir weiter ausnahmslos bei allen übrigen Desamidoproteinen begegnen. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Zd. H. Skraup läßt sich leicht erkennen, daß die Abnahme des Diaminostickstoffs um so größer ist, je größer der Lysingehalt im Ausgangsprotein ist. Das Vitellin enthält nach Osborne und Jones[1]) 1,90°/₀ Histidin, 7,46°/₀ Arginin und 4,81°/₀ Lysin. Nimmt man an, daß die aufgeführten Zahlen durchaus genau sind, so würde eine Abnahme von annähernd 0,92°/₀ N zu erwarten sein, vorausgesetzt, daß nur das Lysin im Desamidovitellin fehlt; wir erhielten eine Abnahme von etwa 1,3°/₀ N, ein Beweis, daß außer dem Lysin vielleicht auch eine andere Hexonbase an Quantität abgenommen hat. Leider verfügten wir über zu wenig Material, um dies nachzuprüfen.

Desamidocasein.

Die Darstellung des Desamidocaseins geschah auf dieselbe Weise wie die des Desamidovitellins. Das Desamidocasein ist ein gelb gefärbtes Pulver, löst sich in ätzenden Alkalien in der Kälte mit gelber, beim Erwärmen mit brauner Farbe auf; die

[1]) Chem. Centralbl. 1909, 1766.

alkalische Lösung, mit Kupfersulfat versetzt, färbt sich rötlichbraun; die Millonsche Reaktion fällt negativ aus.

Verteilung des Stickstoffes.

	Casein 13,83 % N		Desamidocasein 13,60 % N	
	in % der Substanz	in % des Gesamt-N	in % der Substanz	in % des Gesamt-N
Ammoniak-N .	1,39	10,05	1,41	10,36
Monoamino-N .	9,54	69,00	11,11	81,69
Diamino-N . .	2,60	20,03	0,98	7,20
Humin aus Differenz .				

Das Desamidocasein kennzeichnet sich auch durch seinen besonders niedrigen Gehalt an Diaminostickstoff. Diese Tatsache steht wieder im Einklange mit den Angaben von Skraup; nach diesem Verfasser fehlt bekanntlich dem Desamidoprotein nicht nur das Lysin, sondern auch der Arginingehalt ist beträchtlich geringer als beim Casein. Im Vergleich zum Casein besitzt das Desamidocasein einen um 1,89 % geringeren Gehalt an Diaminostickstoff; der Ammoniak und Monoaminostickstoff ist um 1,59 % größer. Es sei hier besonders hervorgehoben, wie labil der Diaminostickstoff im Caseinmolekül gebunden ist, mit welcher Leichtigkeit er sich abspalten läßt.

Ganz anders verläuft die Reaktion, wenn man den Versuch so ausführt: Ein bestimmtes Quantum Casein wird mit etwa dem $\frac{1}{4}$ Teil KNO_2 in der Reibschale unter allmähligem Zusatz von Wasser innig verrieben und das Ganze in einem Becherglas eingetragen und im Wasserbad erwärmt; das Gemisch färbt sich vorübergehend, bis es schließlich eine bleibende dunkelbraune Farbe annimmt; das Casein verflüssigt sich dabei vollständig; das ganze Gemisch ist gut filtrierbar. Läßt man die noch warme Flüssigkeit in verdünnte Essigsäure eintröpfeln, so fällt ein voluminöser Niederschlag aus, welcher nach dem Waschen und Trocknen die Biuret- und Millonsche Reaktion scharf und deutlich aufweist.

Desamidoglutin.

Zufällig hatten wir eine Quantität von β-Glutin vorrätig, also ein Glutin, welches durch anhaltendes Erwärmen seiner wässerigen Lösung in die nicht gelatinierende Modifikation über-

geführt war; mit diesem Präparate wurde die Desamidierung ausgeführt. Das β-Glutin ist in Wasser löslich; zu der wässrigen Lösung wurde Essigsäure zugesetzt und dann verdünnte $NaNO_2$-Lösung tropfenweise eingetragen. Es entsteht hier kein Niederschlag, die Lösung bleibt klar. Um den Überschuß an $NaNO_2$ zu beseitigen, wurde die Lösung der Dialyse mehrere Wochen unterworfen. Zwar ist eine solche Operation mit großen Verlusten verknüpft, denn das Desamidoglutin ist nicht ganz undiffundierbar, jedoch war es der einzige Weg, um es sicher von den fremden Stoffen zu befreien. Das Desamidoglutin ist der einzige desamidierte Proteinstoff, bei welchem die Biuretreaktion sicher nicht ausbleibt und mit voller Schärfe nachweisbar ist.

Verteilung des Stickstoffes.

	Glutin 16,58 % N		Desamidoglutin 16,34 % N	
	in % der Substanz	in % des Gesamt-N	in % der Substanz	in % des Gesamt-N
Ammoniak- N .	0,13	0,78	0,17	1,04
Monoamino-N .	12,80	77,20	13,42	81,14
Diamino-N . .	3,60	21,71	2,72	16,64
Humin aus Differenz .				

Nach den Angaben von Kossel und Kutscher enthält das Glutin 5 bis 6 % Lysin, entsprechend einem Gehalte von annähernd 1 % N (100 Teile Lysin enthalten 19,18 % N); unter Annahme, daß nur das Lysin bei der Desamidierung sich beteiligt, wäre im Desamidoglutin ein etwa 1 % niedrigerer Gehalt aus Diaminostickstoff zu erwarten, wir ermittelten eine Abnahme von 0,88 % N. Die Abnahme an Diamonostickstoff deckt sich auch hier mit der Zunahme an Ammoniak und Monoaminostickstoff.

Desamidogliadin.

Darstellungsweise, wie beschrieben. Das Ausgangsmaterial war ein unreines Handelsgliadin, ein gelblichweißes Pulver. Das Desamidogliadin ist frisch dargestellt gelblichbraun gefärbt, nach dem Trocknen färbt es sich braunrot, in konzentrierter Kalilauge eingetragen löst es sich teilweise auf, die Substanz wird intensiver rot gefärbt; die darüber stehende rote Flüssigkeit abgegossen, mit $CuSO_4$ versetzt, färbt sich bei dem Er-

wärmen rötlichbraun, nicht aber in der Kälte, dieser Vorgang macht den Eindruck einer schwachen Reaktion.

Verteilung des Stickstoffes.

	Gliadin 14,17 % N		Desamidogliadin 15,34 % N	
	in % der Substanz	in % des Gesamt-N	in % der Substanz	in % des Gesamt-N
Ammoniak-N .	2,93	20,67	3,23	21,12
Monoamino-N .	9,93	70,02	10,92	71,85
Diamino-N . .	1,16	8,11	0,98	6,32
Humin aus Differenz .				

Zur Kontrolle der gefundenen Zahlen und der Verteilung des Stickstoffes wurde eine direkte Bestimmung der Mono- und Diaminosäuren vorgenommen. Von der ersteren bestimmten wir nur Glutaminsäure. Wir fanden im Gliadin 31,6%, im Desamidogliadin 32,8% Glutaminsäure. Die Bestimmung der Diaminosäuren mißglückte uns leider: Ein Teil der Flüssigkeit ging uns verloren, jedoch verfolgten wir die Bestimmung bis zu Ende, und wir erzielten ein deutlich krystallinisches Argininpikrolonat, dessen Menge aufweist, daß der Arginingehalt sicher nicht abgenommen hat; sollte hier eine Abnahme der Diaminosäuren vermutet werden, so kann es wahrscheinlich nur im Histidingehalt stattgefunden haben. Von einem gänzlichen Fehlen des Histidins kann sicher keine Rede sein, denn die Reaktion mit Diazobenzosulfosäure (Pauly) fällt stark positiv aus.

Zusammenfassung.

1. In allen Fällen haben wir beobachtet, daß die desamidierten Proteine einen geringeren Gehalt an Diaminostickstoff aufweisen.

2. Die Abnahme an Diaminostickstoff ist um so größer, je größer der Gehalt an Hexonbasen im Ausgangsprotein ist und vor allem an Lysin.

3. Die Abnahme an Diaminostickstoff deckt sich fast genau mit der Zunahme an Ammoniak und Monoaminostickstoff.

4. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß wenigstens ein Teil der Diaminosäuren durch die Wirkung der Salpetrigesäure in Monoamino- resp. Oxyaminosäuren übergeführt wird.

Über die Hemmung der Labwirkung durch Milch.[1])

Von

Kurt Schern.

(Aus der Abteilung für Tierhygiene des Kaiser-Wilhelm-Instituts für Landwirtschaft zu Bromberg.)

(Eingegangen am 7. Juli 1909.)

I.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß die Wirkung des Labenzyms durch verschiedene Agenzien aufgehoben werden kann, so z. B. durch Pferdeblutserum, wie zuerst Hammarsten im Jahre 1887 und nach ihm Rödén festgestellt haben. Hildebrand, Fermi und Pernossi, Camus und Gley, Pugliese und Coggi, ebenso Mathes, Hahn u. v. a. bestätigten die Beobachtungen über den hemmenden Einfluß, den Blutserum nicht nur auf die Wirkung des Lab, sondern auch auf die des Trypsins und Pepsins unter bestimmten Bedingungen ausübt. Es ist diese Tatsache als Antifermentwirkung des Blutserums bezeichnet worden. Theoretisch stellt man sich die antifermentative Wirkung des Blutserums in ähnlicher Weise vor wie die Bindung von Toxin und Antitoxin im Sinne der Ehrlichschen Seitenkettentheorie. Demgemäß ist man berechtigt, z. B. von der Antilabwirkung des Blutes zu sprechen. Von dieser Antilabwirkung des Serums, bzw. der Organsäfte nimmt man an, daß sie eine spezifische ist.

Es ist aber auch zweifellos, daß sich die Hemmung der Labwirkung nach den Angaben von Hailer u. a. auf nicht

[1]) Die Ergebnisse dieser Arbeit sind bereits für die Praxis in entsprechender Form unter Berücksichtigung bestimmter Tatsachen empfohlen worden. Die diesbezügliche Veröffentlichung über „Die Labhemmungsprobe der Milch" erfolgt demnächst in der Berliner Tierärztlichen Wochenschrift.

spezifische Art vollziehen kann, und zwar z. B. durch chemische Körper, wie Alkali, Talkum, Kaolin usw. Die labhemmende Wirkung kranker Milch ist bisher wissenschaftlich nicht geklärt, obgleich die Kenntnis der bloßen Tatsache für industrielle Zwecke in muzurischer Form verwendet wird.

Öfter ist versucht worden, den Antifermentgehalt des Blutes quantitativ zu bestimmen. Morgenroth und Briot haben dies wohl zuerst, fast gleichzeitig bei künstlich mit sterilen Labfermentlösungen immunisierten Tieren getan, deren Blut normalerweise nur sehr geringe, bzw. gar keine hemmenden Eigenschaften für Lab besitzt. Die Autoren sind so in den Besitz eines Antilabs gelangt und berechneten dessen Wertigkeit in ähnlicher Weise, wie es bei der Heilwertbemessung der einzelnen Sera z. B. des Diphtherieheilserums geschieht. In neuerer Zeit ist von Georg Eisner die Hemmung der Labwirkung quantitativ gelegentlich der Beweisführung dafür, daß eine Parallelität bezüglich der Hemmungskraft von Sera gegen Lab, Pepsin, Emulsin, Lipase und Trypsin bei Krebskranken nicht besteht, bestimmt worden.

II.

Im folgenden soll einiges über die Hemmung der Labwirkung berichtet werden. Vor der ausführlichen Wiedergabe der angestellten Versuche sollen einige Angaben über das verwendete Lab sowie über das Verhalten desselben gegenüber normaler Milch und deren Gerinnung nach Labzusatz gemacht werden.

Zunächst ist eine Labstandardlösung nach Morgenroth bereitet worden, welche für alle erwähnten Versuche benutzt wurde.

Diese Labstandardlösung hat den Vorzug, sich im Eisschrank ziemlich lange, $^3/_4$ bis $1^1/_2$ Jahr zu halten, im Gegensatz zu anders hergestellten Lablösungen, die sehr labil sind und deshalb widersprechende Versuchsresultate bei sonst gleichartiger Versuchsanordnung zeitigen. Von dieser Labstandardlösung wurden jedesmal unmittelbar vor dem Versuch Verdünnungen mit 0,85%iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:20, 1:40, 1:80, 1:100, 1:1000 usf. hergestellt. Niemals wurde eine etwa tags zuvor hergestellte Verdünnung der Labstandardlösungen zu späteren Versuchen verwendet; denn die große Labilität des Labenzyms läßt das nicht zu, und man würde bei Nichtberücksichtigung des erwähnten Momentes Gefahr laufen, ungleiche Versuchsresultate zu bekommen.

Es ist erforderlich zu wissen, bis zu welcher Verdünnung die Lablösung frisch ermolkene, normale Milch ohne Serumzusatz zur Gerinnung

bringt, mit anderen Worten, es muß der Titer der Lablösung festgestellt werden.

Bezüglich der bei der Titerbestimmung einer Lablösung verwendeten Milch ist zu bemerken, daß diese möglichst frisch ermolkene sein muß. Die geringste Spur von Säuerung der Milch gibt zu Irrtümern Veranlassung; denn angesäuerte Milch gerinnt noch nach Zusatz so hoher Labverdünnungen, bei denen eine frische Milch nicht gerinnt. Es würde also bei der Benutzung einer sauren Milch als Indicator für die Labwirkung der Titer der zu prüfenden Lablösung zu hoch angesetzt werden. Hiervon habe ich mich selbst durch ad hoc angestellte Versuche überzeugt.

Bei dem Austitrieren der Lablösung bemerkt man bald, daß Milch nach dem Zusatz, namentlich der höheren Verdünnungen des Labenzyms im Wasserbad bei einer zwischen 30 bis 40° C liegenden Temperatur, bei der die Reaktion angestellt wird, nicht gerinnt. Das ist aus folgendem Versuch ersichtlich:

Von der Labstandardlösung wird eine Verdünnung im Verhältnis 1:1000 hergestellt. Von dieser Verdünnung wird je 1 ccm mit verschiedenen Mengen Milch in Reagensröhrchen[1]) vermischt, so daß hieraus bestimmte Endverdünnungen des Lab in bezug auf die vorhandene Gesamtflüssigkeitsmenge resultieren. Die Mischungen werden ins Wasserbad bei 37° gestellt und nach verschiedenen Zeitabständen besichtigt. Den Versuch veranschaulicht die folgende Tabelle.

Von der Labverdünnung 1:1000	Von der Milch	Endverdünnung des Labenzyms	Nach 1 Std. bei 37°	Nach 2 Std. bei 37°	Nach 3 Std. bei 37°	Nach 6 Std. bei 37°	Nach 24 Std. bei 37°
1 ccm	2 ccm	3000	Ist nicht geronnen	Ist nicht geronnen	Ist nicht geronnen	Ist nicht geronnen	Ist nicht geronnen
1 „	3 „	4000	„	„	„	„	„
1 „	4 „	5000	„	„	„	„	„
1 „	5 „	6000	„	„	„	„	„
1 „	6 „	7000	„	„	„	„	„
1 „	7 „	8000	„	„	„	„	„

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, gerinnt die Milch bei der gewählten Versuchsanordnung selbst nach 24 Stunden nicht. Ein ganz anderes Resultat wird erzielt, wenn man die Vorschrift Morgenroths berücksichtigt, nämlich die Milch-Lablösungsmischungen vor dem Verbringen in das Wasserbad 24 Stunden lang im Eisschrank stehen zu lassen. Durch längeren Aufenthalt bei 37° wird das Labenzym nach Morgenroths Ansicht zerstört. Hält man dagegen die Mischungen erst 24 Stunden bei 0 bis 8° und bringt sie dann in das auf 37° eingestellte Wasserbad, so tritt sehr bald und in den größere Mengen Lab ent-

[1]) Am besten ist es, wenn die Versuche in Reagensröhrchen aus Jenaer Glas angestellt werden. Für einfachere Versuche genügen die gewöhnlich im Laboratorium gebrauchten Röhrchen.

haltenden Röhrchen fast momentan Gerinnung ein. Die Reaktion ist nach einem 2 bis 3stündigen Verweilen der beschickten Röhrchen im Wasserbad beendet. Das lehrt der folgende Versuch.

Von der Labverdünnung 1:1000	Von der Milch	Endverdünnung des Labenzyms	Nach 24stünd. Aufenthalt im Eisschrank	Nach 2stünd. Aufenthalt bei 37°	Nach 4stünd. Aufenthalt bei 37°	Nach 24stünd. Aufenthalt bei 37°
1 ccm	2 ccm	3000	Unverändert	Geronnen	Geronnen	Geronnen
1 „	3 „	4000	„	„	„	„
1 „	4 „	5000	„	Fängt an, Gerinnsel zu bilden	Einige, sehr kleine Gerinnsel in der Milch	Einige, sehr kleine Gerinnsel in der Milch
1 „	5 „	6000	„	Nicht geronn.	Nicht geronn.	Nicht geronn.
1 „	6 „	7000	„	„	„	„
1 „	7 „	8000	„	„	„	„

Hiernach ist die Milch bei einem Labzusatz im Verhältnis 1:4000, bzw. 1:5000 bereits nach 2 Stunden geronnen. Der Gerinnungsprozeß schreitet bei einem über 2 Stunden dauernden Aufenthalt der Röhrchen im Wasserbad nicht weiter fort. Denn in den die höheren Labverdünnungen enthaltenden Röhrchen ist eine Gerinnung der Milch selbst nach 24 Stunden nicht eingetreten. Der Titer der verwendeten Lablösung liegt demnach zwischen 4000 und 5000. Eine sichere und einwandfreie Gerinnung der Milch findet statt bei dem Zusatz des Lab in der Verdünnung 1:4000. Natürlich müssen derartige Titerbestimmungen von Lablösungen stets an mehreren Proben verschiedener normaler Milch stattfinden.

Für die weiter unten folgenden Versuche ist es von Bedeutung, die Menge der zugesetzten Lablösung zu kennen, bei der die Gerinnung der Milch noch sicher erfolgt, wenn diese nach Zusatz des Lab nur 1 Stunde im Eisschrank und hierauf sofort bei 37° gestellt wird. Ferner ist es für die Gleichmäßigkeit der ganzen Versuchsanordnung zweckmäßig, wenn alle Röhrchen gleiche Milch- bzw. Flüssigkeitsmengen enthalten. Deshalb werden bei den folgenden Versuchen in jedes Röhrchen nur 4 ccm Milch gefüllt, dazu wird die erforderliche Menge Lab gesetzt, und sämtliche Röhrchen werden mit physiologischer NaCl-Lösung bis auf 5 ccm aufgefüllt, hiernach 1 Stunde in den Eisschrank und dann 2 Stunden ins Wasserbad bei 37° gestellt.

Vor der Labstandardlösung werden für den zunächst folgenden Versuch Verdünnungen 1:20 und 1:40 hergestellt und diese wie folgt verwendet.

Von der Milch verwendet ccm	Von der Labverdünnung 1:20 verwendet ccm	Die zugesetzte NaCl-Lösung beträgt: ccm	Nach 1 Std. Aufenthalt im Eisschrank	Nach 1 Std. Aufenthalt bei 37°	Nach 2 Std. Aufenthalt bei 37°	Nach 3 Std. Aufenthalt bei 37°	Die Endverdünnung des Lab beträgt:
4	1	—	Unverändert	Ist geronnen	Ist geronnen	Ist geronnen	1:100
4	0,5	0,5	„	„	„	„	1:200
4	0,33	0,66	„	„	„	„	1:300
4	0,25	0,75	„	„	„	„	1:400
4	0,2	0,8	„	„	„	„	1:500

Von der Milch verwendet ccm	Von der Labverdünnung 1:40 verwendet ccm	Die zugesetzte NaCl-Lösung beträgt: ccm	Nach 1 Std. Aufenthalt im Eisschrank	Nach 1 Std. Aufenthalt im Wasserbad bei 37°	Nach 2 Std. Aufenthalt im Wasserbad bei 37°	Nach 3 Std. Aufenthalt im Wasserbad bei 37°	Die Endverdünnung des Lab beträgt:
4	0,32	0,68	Unverändert	Ist geronnen	Ist geronnen	Ist geronnen	1:600
4	0,28	0,72	„	Ist nicht geronnen	„	„	1:700
4	0,24	0,76	„	„	„	„	1:800
4	0,22	0,78	„	„	„	„	1:900
4	0,2	0,8	„	„	„	„	1:1000
4	0,16	0,84	„	„	„	„	1:1200
4	0,14	0,86	„	„	„	„	1:1400
4	0,12	0,88	„	„	Ist nicht geronnen	Zeigt Bildung zarter, sehr kleiner Gerinnsel	1:1600
4	0,11	0,89	„	„	„	Bildung von zarten und kleinen Flöckchen an der Wand des Röhrchens	1:1800
4	0,1	0,9	„	„	„	Ist nicht geronnen	1:2000

Bei dieser Versuchsanordnung, bzw. Titerbestimmung gerinnt die Milch sicher innerhalb 2 Stunden bei einem Labzusatz bis zu der Verdünnung 1:1400, während bei geringerem Labzusatz teilweise oder völlige Hemmung der Labwirkung beobachtet wird. Diese wird auch nicht wesentlich beeinträchtigt bei noch längerem als dem angegebenen Verweilen der Milch-Lablösungsmischungen bei 37°.

Es ist in den folgenden Versuchen stets von der Lablösung zu den jeweilig untersuchten 4 ccm Milch bis zu einer Verdünnung von 1:1400 hinzugesetzt worden.

Es sei noch einiges kurz über die Art der Gerinnung der Milch bei Anstellung der Versuche gesagt. Die Milch kann weich, fest, flockig, stückig, klumpig gerinnen, es kann sich ein Bodensatz, oder es können

sich kräuselartige Flocken an der Wand des Röhrchens bilden u. v. a. m. Um ein möglichst einwandfreies Resultat bezüglich der Gerinnung bei den Versuchen zu erzielen, ist es zweckmäßig, wenn die Röhrchen während der ganzen Dauer des Aufenthaltes im Wasserbad völlig unberührt bleiben. Mitunter kann der Gerinnungsprozeß durch eine Erschütterung gestört werden. Man beobachtet häufig, daß Milch schon nach $^1/_2$stündigem Aufenthalt im Wasserbad fest geronnen erscheint. Wird sie dann leicht geschüttelt, so löst sich eine geronnene Schicht, die oben auf der Milch liegt, ab und schwimmt als plattenartiges Gebilde auf dem anderen, völlig flüssigen Material. Wird eine solche Milch nochmals bei 37° gehalten, so schreitet die Gerinnung nicht weiter fort.

Als geronnen ist auch eine Milch zu betrachten, welche an der Wand des Röhrchens beim Schräghalten Flocken absetzt. Ein solcher Befund nach längerer Beobachtungsdauer bei 37° an der Milch erhoben, ist natürlich anders zu bewerten, als wenn er nach z. B. 1stündigem Verweilen der Milch bei 37° erhoben wird. Im ersten Falle deutet das Resultat auf eine größere Hemmung der Labwirkung hin. Überhaupt muß davor gewarnt werden, bei den Resultaten solcher biologischen Versuche mit mathematischer Genauigkeit schematisieren zu wollen.

Erwähnt sei auch, daß die Ausführung der Versuche in dem schon für andere Zwecke angegebenen Thermodiaskop[1]) vorgenommen werden kann, was namentlich für kleinere Laboratorien empfehlenswert ist.

III.

a) Bei den Versuchen ist zunächst geprüft worden, ob normales, frisches Rinderserum, zu Milch hinzugesetzt, das ebenfalls hierzu hinzugefügte Lab in seiner Wirkung paralysiert, wie es nach den in der Literatur verzeichneten Angaben wahrscheinlich ist.

Es wird in Reagensröhrchen zu je 4 ccm normaler frischer Milch zunächst Serum, dann physiologische Kochsalzlösung und hiernach je 0,2 ccm der Lablösung 1:40 hinzugesetzt. Danach werden die gut durchgeschüttelten Mischungen 1 Stunde im Eisschrank und hiernach 2 Stunden im Wasserbad bei 37° gehalten. Die näheren Angaben finden sich in der folgenden Tabelle (S. 237).

Somit hat in diesem Versuch das Rinderserum die Labwirkung gehemmt.

Das gleiche ist in vielen anderen gleichartigen Versuchen beobachtet worden, bei denen eine noch geringere Menge von Serum als 0,05 ccm die Labwirkung gehemmt hat.

---

[1]) Der Apparat ist käuflich zu haben bei der Firma Paul Altmann, Berlin, Luisenstr.

Demnach scheint es berechtigt, zu sagen, daß normales Rinderserum, zu normaler, frischer Milch hinzugesetzt, die Labwirkung hemmt.

Es soll hier nicht weiter erörtert werden, worauf diese Hemmung beruht. Wahrscheinlich ist, daß im Rinderserum ein Körper vorhanden ist, den man im Sinne der Immunitätslehre als Antilab bezeichnen könnte. Dabei ist es gleichgültig, wie die Paralysierung der Labwirkung zustande kommt.

Von der normalen Milch ccm	Von der Lablösung 1:40 ccm	Vom Rinderserum ccm	Von der physiologischen Kochsalzlösung ccm	Die Endverdünnung des Labes ist	Resultat	Bemerkungen
4	0,2	0,2	0,6	1:1000	Ist nach zwei Stunden Aufenthalt bei 37° nicht geronnen	—
4	0,2	0,1	0,7	„	„	—
4	0,2	0,05	0,75	„	„	—
4	0,2	—	0,8	„	ist geronnen	Kontrolle

b) Aber es liegt nach den obigen Feststellungen sehr nahe, Milch, die von euterkranken Kühen stammt, bezüglich ihrer hemmenden Eigenschaft auf die Labwirkung in der Erkenntnis der in der Pathologie ja allgemein bekannten Tatsache zu untersuchen, daß bei jeder Entzündung neben der chemotaktischen Wirkung auf die weißen Blutkörperchen auch eine lymphagoge auf die Flüssigkeit in den Gefäßen ausgeübt wird. Demnach ist bei der Entzündung u. a. die Zufuhr von Flüssigkeit aus den Gefäßen in das Gewebe erhöht und vermehrt. Bei einer Euterentzündung wird sich diese Flüssigkeit, die ihren Ursprung aus dem Blut nimmt, wohl in den meisten Fällen der vom Euter produzierten Milch beimischen. Eine derartig veränderte, bzw. pathologische Milch müßte somit bei Zusatz von Lab nicht mehr gerinnen.

Um dies zu beweisen, wird wiederholt die Milch von Kühen untersucht, welche an Euterentzündung leiden.

Hierbei hat sich ergeben, daß ein mastitisches Sekret, welches schon makroskopisch ohne weiteres als solches erkannt wird, zu einer normalen Milch hinzugesetzt, die Labwirkung in

ähnlicher Weise hemmt wie normales Rinderserum. Hiervon habe ich mich des öfteren überzeugen können. Die diesbezüglichen Versuche haben gelehrt, daß die labhemmende Wirkung eines mastitischen Sekretes ungefähr dem Grade seiner Veränderung entspricht, d. h. ist das Eutersekret hochgradig pathologisch verändert, so daß es beispielsweise im Aussehen etwa schalem Weißbier ähnelt, so ist die labhemmende Wirkung eine sehr bedeutende, hat dagegen das pathologische Eutersekret noch eine milchähnliche Beschaffenheit, so ist die labhemmende Wirkung nicht so sehr bedeutend.

Von der Richtigkeit dieser Anschauung kann man sich durch folgende Versuche überzeugen.

Am 20. III. 08 gelangt übersandtes mastitisches Sekret zur Untersuchung. Es gleicht im Aussehen und in der Konsistenz schalem Weißbier. Somit ist es schon von vornherein als aus einem kranken Euter stammend gekennzeichnet und hochgradig verändert. Es werden in Reagensröhrchen zu je 4 ccm normaler Milch bestimmte Mengen 0,85%iger Kochsalzlösung, dann mastitisches Sekret und hiernach je 0,14 ccm der Lablösung 1:40 hinzugesetzt. Die gut durchgeschüttelten Mischungen, welche wie völlig normale Milch aussehen, werden 1 Stunde im Eisschrank und hiernach 2 Stunden in das auf 37° eingestellte Wasserbad gebracht.

Von der normalen Milch ccm	Von der 0,85%igen NaCl-Lösung ccm	Von dem mastitisch. Sekret ccm	Von der Lablösung 1:40 ccm	Resultat des Versuches	Bemerkungen
4	0,86	—	0,14	ist geronnen	ist Kontrolle
4	0,16	0,7	„	ist nicht geronnen	—
4	0,26	0,6	„	„	—
4	0,36	0,5	„	„	—
4	0,46	0,4	„	„	—
4	0,56	0,3	„	„	—
4	0,66	0,2	„	„	—
4	0,76	0,1	„	„	—
4	0,81	0,05	„	„	—

Der gleiche Versuch wird öfter mit demselben Resultat wiederholt. Es ist somit das hochgradig veränderte Sekret

noch in Mengen von 0,05 ccm durch seinen hemmenden Einfluß auf die Labwirkung nachweisbar gewesen.

Andere Ergebnisse sind bei einem nicht sehr von normaler Milch im Aussehen abweichenden mastitischen Sekret im folgenden Versuch erzielt worden.

Am 27. III. 08 übersendet Tierarzt F. zu P. eine Flasche mit „kranker" Milch. Diese hat fast das Aussehen und die Konsistenz normaler Milch, besitzt aber einen leicht gelblichgrauen Farbenton. Die Leukocytenprobe nach Trommsdorf ergibt einen Bodensatz von Blut und Leukocyten, der weit die am Röhrchen angebrachte Skala übersteigt.

Die Versuchsanordnung ist dieselbe wie im vorstehenden Versuch, nur sind die verwendeten Mengen des zugesetzten mastitischen Sekretes größer bemessen worden, um Hemmung der Labwirkung zu erzielen.

Von der normalen Milch ccm	Von der 0,85 %igen NaCl-Lösung ccm	Von den mastitisch. Sekret ccm	Von der Lablösung 1:40 ccm	Resultat des Versuches	Bemerkungen
3,86	—	1	0,14	ist nicht geronnnen	—
4	0,56	0,3	„	„	—
4	0,66	0,2	„	ist geronnen	—
4	0,76	0,1	„	„	—
4	0,86	—	„	„	Kontrolle

In diesem Versuch hat ein Zusatz von 0,3 ccm mastitischen Sekretes zur Milch die Labwirkung gehemmt, während dies bei einem Zusatz von 0,2 ccm mastitischen Sekretes zu Milch derselben Provenienz nicht der Fall ist.

Es tritt in diesem Versuchsresultat deutlich der Unterschied gegen die in der ersten am 20. III. 08 mit mastitischem Sekret angestellten Untersuchung in Erscheinung. Offenbar enthalten die hochgradig veränderten Eutersekrete viel mehr hemmende Substanzen für die Labwirkung als die geringgradig veränderten. Ob allein die in dem mastitischen Sekret enthaltene Flüssigkeit oder die Leukocyten oder die Erythrocyten hemmend für die Labwirkung sind, soll dahin gestellt bleiben. Mit Wahrscheinlichkeit ist anzunehmen, daß die Flüssigkeit den Hauptanteil der labhemmenden Substanzen in sich birgt.

c) Eine genaue quantitative Bewertung dieser Substanzen ist nicht ohne weiteres möglich. Um diese labhemmenden Substanzen der pathologischen Eutersekrete quantitativ zu bestimmen, verfährt man ebenso wie bei anderen quantitativen biologischen Bestimmungen.

Der Titer einer Lablösung gibt an, in welchem Verhältnis Lab und normale Milch vermischt werden müssen, damit letztere gerinnt. Dieses Verhältnis gibt die Grundlage ab für die Berechnung der in einer pathologischen Milch vorhandenen Menge von labhemmenden Substanzen. Wenn eine pathologische Milch, die infolge einer Euterentzündung labhemmende Substanzen enthält, nach Labzusatz vielleicht noch gerinnen soll, so muß zu einer solchen Milch mehr Lab hinzugesetzt werden als zu einer normalen.

Es ist demnach zur Gerinnung der pathologischen Milch das Mehrfache der normal wirksamen Labmenge erforderlich. Dieses „Mehr" von zugesetztem Lab gibt den Maßstab ab für die Berechnung der Menge labhemmender Substanzen, welche in einem mastitischen Eutersekret vorhanden sind.

Folgender Versuch, der am 1. V. 08 angestellt wird, mag das Gesagte erläutern:

Eine Kuh des Besitzers Schm. zu B. soll auf dem rechten, hinteren Euterviertel krank sein. Bei der Untersuchung des fraglichen Euterviertels ergibt sich, daß es sich im Gegensatz zu den übrigen drei Eutervierteln schlaff und welk anfühlt. Schmerzen äußert das Tier bei der Palpation des Euters nicht, aber man fühlt bei dieser ziemlich dicht unter der Haut deutlich vereinzelte, derbe, ungefähr haselnußgroße Knoten. Die Gesamtmischmilch dieser Kuh bietet bei der gewöhnlichen Untersuchung keine Besonderheiten. Bei der Betrachtung der Milchproben der einzelnen Striche bemerkt man, daß die aus dem hinteren, rechten Euterviertel stammende Milch aufgehellt ist und einen ganz leicht-grauen Farbenton hat. Die Leukocytenprobe der Milch des hinteren, rechten Euterviertels liefert einen deutlich sichtbaren, gelbtransparenten, jedoch mit der am Röhrchen angebrachten Skala nicht meßbaren Bodensatz, dessen Kuppe in der Größe eines kleinen Stecknadelkopfes gerötet ist. Im gefärbten mikroskopischen Ausstrichpräparat des Bodensatzes sieht man neben roten Blutkörperchen viele Leukocyten und Streptokokken. Die Leukocytenprobe der drei anderen Euterviertel ergibt keine Besonderheiten. Nach diesem Befunde ist man berechtigt, zu sagen, das rechte hintere Euterviertel der Kuh und die von ihm gelieferte Milch ist trotz des negativen Ausfalles der Leukocytenprobe als nicht der Norm entsprechend zu bezeichnen.

Die aus den vier Strichen gelieferte Milch wird im Verhältnis 4:4 gemischt und mit dieser Mischmilch in der bekannten Weise (1 Stunde auf Eis, dann 2 Stunden bei 37°, von der Lablösung 1:40) folgender Versuch angestellt:

Von der Milch ccm	Von der 0,85%igen NaCl-Lösung ccm	Von der Lablösung 1:40 ccm	Resultat des Versuches	Endverbindung des Lab	Bemerkungen
4	0,86	0,14	ist nicht geronnen	1:1400	—
4	0,84	0,16	„	1:1200	—
4	0,8	0,2	„	1:1000	—
4	0,76	0,24	ist geronnen	1:800	—
4	0,68	0,32	„	1:600	—
4 von einer norm. Milch	0,86	0,14	„	1:1400	ist Kontrolle

Es ist also, um die Mischmilch dieser Kuh zum Gerinnen zu bringen, das 1,75fache der normal wirksamen Labmenge erforderlich. Infolgedessen sind 1,75mal mehr labhemmende Substanzen in dieser Milch vorhanden als in einer normalen.

Mit Rücksicht auf den Ausfall dieses Versuches mit Mischmilch wird die Milch jedes einzelnen Striches in derselben Weise untersucht.

Der Übersichtlichkeit wegen sollen in der folgenden Tabelle, da ja die genaue Ausführung der Versuche aus den vorhergehenden Protokollen zur Genüge ersichtlich ist, nur die Endverdünnung des Lab und das Resultat der Untersuchung angegeben werden.

Milch des Striches	Endverdünnung des Lab							
	1:1400	1:1200	1:1000	1:800	1:600	1:400	1:200	1:100
Vorn rechts	geronnen	geronnen	geronnen	geronnen	geronnen	geronnen	geronnen	geronnen
Vorn links	„	„	„	„	„	„	„	„
Hinten links	„	„	„	„	„	„	„	„
Hinten rechts	nicht geronnen	nicht geronnen	nicht geronnen	nicht geronnen	nicht geronnen	nicht geronnen	nicht geronnen	geronnen

Die Milch des vorderen rechten, des vorderen linken, des hinteren linken Striches gerinnt nach Labzusatz im Verhältnis 1:1400, also wie normale Milch.

Dagegen ist zur Gerinnung der Milch des hinteren rechten Striches das 14fache der normalen Labmenge erforderlich. Also enthält diese Milch 14mal mehr labhemmende Substanzen als normale Milch.

So kann man die Quantität der labhemmenden Substanzen in einem mastitischen Sekret bestimmen.

Das hat nicht nur ein theoretisches, sondern auch ein praktisches Interesse. Denn die Resultate der obigen Versuche weisen auf die Möglichkeit hin, mit Hilfe der Methode der Labhemmung euterkranke Kühe, bzw. pathologische Milch zu erkennen.

Ferner wird die Labhemmung durch mastitisches Sekret eine Bedeutung haben bei der Verdauung.

d) Zunächst ist eine größere Anzahl von Versuchen angestellt worden, die darüber Aufschluß bringen sollten, ob die Methode mit Sicherheit für den gedachten Zweck verwendet werden kann.

Die Versuchstechnik ist dieselbe wie in den bisherigen Versuchen. Die einzelnen Versuchsreihen sind, um ein schnelleres Resultat zu erzielen, nicht nur in der bereits austitrierten Endlabverdünnung von 1:4000, bei der normale Milch noch gerinnt, sondern, um den praktischen Verhältnissen Rechnung zu tragen, auch gleich in der von 1:1000, 1:600, 1:200 angesetzt worden. Es erinnert diese Methodik sehr an andere biologische Verfahren, z. B. an das, welches zur Ermittlung rotzkranker Pferde benutzt wird, wie es von Schütz und Mießner für die Rotzdiagnose (Agglutination) angegeben ist.

Zugleich wird neben dieser Untersuchung die Leukocyten-Probe mit jeder in den Versuch gelangenden Milch vergleichsweise ausgeführt.

Ergibt sich bei der ersten Prüfung der Mischmilch hierbei, daß eine größere als die normale Menge Lab erforderlich ist, um die Milch zur Gerinnung zu bringen, so wird die Untersuchung an den beiden folgenden Tagen nochmals mit frischer Milch derselben Provenienz wiederholt und hiernach gegebenen Falles auf die Milch jedes einzelnen Striches ausgedehnt.

Misch-milch der Kuh Nr.	Endverdünnung der Lablösung 1:40				Ergebnis der Leukocytenprobe
	1:1400	1:1000	1:600	1:200	
1	nicht geronnen	geronnen	geronnen	geronnen	0,5
2	geronnen	„	„	„	deutliche Spur
3	nicht geronnen	„	„	„	„
4	geronnen	„	„	„	kleine Spur
5	„	„	„	„	„
6	„	„	„	„	„
7	„	„	„	„	„
8	„	„	„	„	kein Bodensatz
9	„	„	„	„	Spur
10	nicht geronnen	„	„	„	„
11	„	nicht geronnen	„	„	deutliche Spur
12	geronnen	geronnen	„	„	0,5
13	nicht geronnen	„	„	„	0,5
14	geronnen	„	„	„	Spur
15	„	„	„	„	„
16	„	„	„	„	„
17	„	„	„	„	„
18	„	„	„	„	„
19	nicht geronnen	nicht geronnen	„	„	0,1 deutl. abgesetzt u. gelber Bodensatz
20	geronnen	geronnen	„	„	Spur
21	„	„	„	„	„
22	„	„	„	„	deutlich abgesetzte Spur
23	„	„	„	„	Spur
24	„	„	„	„	kleine Spur
25	„	„	„	„	„
26	„	„	„	„	„
27	„	„	„	„	Spur
28	„	„	„	„	kleine Spur
29	„	„	„	„	„
30	„	„	„	„	kein Bodensatz
31	„	„	„	„	„
32	nicht geronnen	nicht geronnen	„	„	kleine Spur blutiger Bodensatz
33	geronnen	geronnen	„	„	Spur
34	„	„	„	„	„
35	„	„	„	„	„
36	„	„	„	„	„

Mit Ausnahme der Resultate bei der Milch der Kuh Nr. 11, 19 und 32 sind die Ergebnisse so zu deuten, daß die Milchproben in normaler Weise vom Lab zur Gerinnung gebracht werden. Dagegen ist bei den Kühen Nr. 11, 19 und 32 die Hemmungskraft der Milch für Lab scheinbar größer als normal.

Deshalb wird am nächsten und übernächsten Tage nochmals die Milch der Kühe Nr. 11, 19 und 32 mit folgendem Resultat untersucht.

Mischmilch der Kuh[1]) Nr.	Endverdünnung des Lab					Ergebnis der Leukocytenprobe
	1:1400	1:1200	1:1000	1:800	1:600	
11	geronnen	geronnen	geronnen	geronnen	geronnen	Spur
19	nicht geronnen	nicht geronnen	„	„	„	„
32	geronnen	geronnen	„	„	„	kleiner Bodensatz, rein gelb

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß bezüglich der Gerinnung einer Milch, die aus gesunden Eutern stammt, durch eine austitrierte Lablösung physiologische Schwankungen hinsichtlich des Labtiters vorkommen, die man „Schwellenwerte“ nennen kann.[2]) Diese Schwellenwerte scheinen bei der in den obigen Versuchen benutzten Lablösung, die einen Titer von 1 : 1400 hat, ungefähr von der Endlabverdünnung 1 : 1400 nicht ganz bis zur Endlabverdünnung 1 : 1000 zu reichen.

Sind größere Labmengen zur Gerinnung erforderlich, so ist die betreffende Milch als „verdächtig“ zu bezeichnen.

Das deutet darauf hin, daß die Milch und ebenso die betreffende milchliefernde Kuh wiederholt zu untersuchen und unter Beobachtung zu stellen ist.

[1]) Die Mischmilch ist so hergestellt worden, daß aus jedem Strich 10 ccm entnommen und die 4 × 10 ccm gemischt wurden.

[2]) Hierzu sei bemerkt, daß vielleicht im Verlauf einer chronischen Entzündung bei sich öfter wiederholender Untersuchung der Milch auf labhemmende Substanzen auch Schwankungen vorkommen, die der jeweiligen Art und dem Grade des Entzündungsprozesses entsprechen, immer aber als auf pathologischer Basis beruhend gekennzeichnet sein werden. Ich habe bei diesen Untersuchungen derartige „Schwankungen“ nicht beobachten können.

Die Beurteilung der Schwellenwerte richtet sich danach, ob man die Mischmilch einer Kuh untersucht oder ob man die Milch von einzelnen Strichen gesondert für sich untersucht. Bei Mischmilch sind die Schwellenwerte in engere Grenzen zu legen als bei Milch eines einzelnen Striches. Im folgenden sollen noch einige derartige Untersuchungen mitgeteilt werden, welche in der bekannten Weise angestellt worden sind.

4 ccm Milch der Kuh Nr.	Endverdünnung des Lab				Ergebnis der Leukocytenprobe
	1:1400	1:1200	1:1000	1:800	
1	geronnen	geronnen	geronnen	geronnen	Spur
2	"	"	"	"	"
3	"	"	"	"	"
4	"	"	"	"	"
5	"	"	"	"	"
6	"	"	"	"	"
7	"	"	"	"	"
8	"	"	"	"	kein Bodensatz
9	"	"	"	"	"
10	"	"	"	"	"
11	"	"	"	"	Spur
12	nicht geronnen	nicht geronnen	nicht geronnen	nicht geronnen	"
13	"	"	"	"	"
14	"	"	"	"	0,2
15	geronnen	geronnen	geronnen	geronnen	Spur

Die Milch der Kühe Nr. 1 bis 11 und 15 ist auf Labzusatz wie normale Milch geronnen, dagegen hat sich die Milch der Kühe Nr. 12, 13 und 14 in dieser Hinsicht abweichend verhalten, Deshalb wird nochmals die Milch der einzelnen Striche dieser Kühe untersucht. (Siehe Tabelle auf der nächsten Seite.)

Hiernach hat sich der ursprünglich bei der Untersuchung entstandene Verdacht einer bestehenden Mastitis bei den Kühen Nr. 12 und 13 nicht bestätigt. Die Milch des rechten und linken hinteren Striches der Kuh Nr. 14 ist nach Zusatz der normalen Labmenge geronnen, dagegen ist dies nicht der Fall gewesen bei der Milch des vorderen linken Striches. Das 7fache der normalen Mengen Lab ist erforderlich, um diese Milch zur Gerinnung zu bringen. Das läßt den Verdacht entstehen, daß sich an dem vorderen linken Strich des Euters des Kuh Nr. 14

Milch der Kuh Nr.	Bezeichnung des Euterstriches	Endverdünnung des Lab				Ergebnis der Leukocytenprobe
		1:1400	1:1000	1:600	1:200	
12	vorne rechts	geronnen	geronnen	geronnen	geronnen	kein Bodensatz
12	vorne links	"	"	"	"	kein Bodensatz
12	hinten rechts	nicht geronnen	"	"	"	Spur
12	hinten links	"	"	"	"	kein Bodensatz
Mischmilch[1]) der Kuh Nr. 12	—	geronnen	"	"	"	kleine Spur
13	vorne rechts	"	"	"	"	kein Bodensatz
13	vorne links	"	"	"	"	Spur
13	hinten rechts	nicht geronnen	"	"	"	"
13	hinten links	geronnen	"	"	"	"
Mischmilch[1]) der Kuh Nr. 13	—	"	"	"	"	"
14	vorne rechts	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt
14	vorne links	nicht geronnen	nicht geronnen	nicht geronnen	geronnen	kleine Spur
14	hinten rechts	"	geronnen	geronnen	"	Spur
14	hinten links	"	"	"	"	kein Bodensatz
Mischmilch[1]) der 3 Striche der Kuh Nr. 14	—	nicht geronnen	nicht geronnen	geronnen	geronnen	Spur

ein entzündlicher Prozeß abspielt. (Leider konnte die Milch dieser Kuh nicht weiter untersucht werden, da der Besitzer das Tier inzwischen verkauft hatte.) Die Leukocytenprobe dieser Milch fällt zwar negativ aus und erweckt somit keinen Verdacht auf das Vorhandensein einer Entzündung. Dem darf aber keine allzu große Bedeutung beigemessen werden; denn die Annahme ist nicht gerechtfertigt, daß bei einer Entzündung jedesmal unbedingt Leukocyten nachweisbar sein müssen.

[1]) Die Mischmilch war so hergestellt, daß aus jedem Strich 10 ccm entnommen und diese 4×10 ccm untereinander gemischt waren.

Es sollen im Anschluß hieran noch von Untersuchungen, die an 97 Kühen in der bekannten Weise ausgeführt worden sind, die Fälle erwähnt werden, bei denen das Bestehen einer Euterentzündung vermutet wird.

Milch der Kuh Nr.	Endverdünnung des Lab				Ergebnis der Leukocytenprobe	Bemerkungen
	1:1400	1:1000	1:600	1:200		
15 Sch. G.	nicht geronnen	nicht geronnen	nicht geronnen	nicht geronnen	2,0	—
8 H.	„	„	„	„	1,0	—
9 H.	„	„	„	„	1,0	—
10 H.	„	„	geronnen	geronnen	0,5	—
11 H.	„	„	nicht geronnen	nicht geronnen	1,0	—
1 Br.	„	„	geronnen	geronnen	0,8	—
6 Br.	„	„	„	„	Capillare verstopft, dicker Bodensatz	—
7 Br.	„	„	„	„	0,6	—
22 Br.	„	„	„	„	0,9	—
5 (normale, gesunde Milch)	geronnen	geronnen	geronnen	geronnen	Spur	Ist Kontrolle

Der Verdacht auf Euterentzündung, der bei den in der Tabelle erwähnten Kühen auf Grund des Ausfallens der Autolabbestimmung und der Leukocytenprobe entstand, wurde durch die klinische Untersuchung bestätigt. Nur die Kuh 10 H. wies keine pathologischen Veränderungen auf, sollte aber infolge von Unachtsamkeit seitens des Melkers nicht gut ausgemolken worden sein. Ob sie später erkrankt ist, ließ sich nicht feststellen, da sie verkauft wurde.

Die Ergebnisse der vorstehenden Untersuchungen weisen darauf hin, daß es mit der Methode der Labhemmung gelingt, euterkranke Kühe als auch pathologische Milch zu ermitteln.

Literatur.

1. Briot, Thèse de Paris 1900.
2. Camus und Gley, Soc. de Biol. 1897.
3. Georg Eisner, Zeitschr. f. d. Immunitätsforschung u. experim. Ther. 1, Heft 5, S. 650.
4. Fermi, Arch. f. Hygiene 10, 1890.
5. Fermi, Arch. f. Hygiene 55.
6. Fermi und Pernossi, Zeitschr. f. Hygiene 18, 1899.
7. Fuld und Spiro, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 132, 1900.
8. Hahn, Berl. klin. Wochenschr. 1897.
9. Haier, Arbeiten aus d. Kaiserl. Gesundsamt 29, Heft 2, 1908.
10. Hammarsten, Malys Jahresber. 1887.
11. Mathes, Centralbl. f. med. Wiss. 1894.
12. Morgenroth, Centralbl. f. Bakt. 26, 1899.
13. Morgenroth, Centralbl. f. Bakt. 27, 1900.
14. Pugliese und Coggi, Bulletino Scienze med. 1897.
15. Rodén, ref. v. Hammarsten, Malys Jahresber. 1887.
16. Rühm, Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene 1909.
17. Schern, diese Zeitschr. 18, 1909.
18. Schern, Monatsh. f. prakt. Tierheilk. 1909.
19. Schütz und Mießner, Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk. 1905
20. Trommsdorf, Münch. med. Wochenschr. 1906, Nr. 12.
21. Trommsdorf, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1906, Nr. 15.
22. Trommsdorf, Arch. f. Hygiene 59, 224, 1906.
23. Trommsdorf und Rullmann, Arch. f. Hygiene 26, Heft 2, S. 137.

Wirkung der Silbersalze auf die Autolyse der Leber.

Von

G. Izar.

(Aus dem Institut für spezielle Pathologie innerer Krankheiten der Kgl. Universität zu Pavia.)

(Eingegangen am 13. Juli 1909.)

Die beschleunigende Wirkung des Silberhydrosols auf die Autolyse der Leber[1]) veranlaßte mich zu untersuchen, welchen Einfluß die Silbersalze auf denselben Prozeß haben. Zu diesem Zwecke habe ich eine Reihe von Salzen und löslichen Verbindungen des Silbers geprüft, indem ich zugleich die Wirkung festzustellen suchte, die sie auf die verschiedenen Endprodukte des autolytischen Prozesses ausüben. Bei einigen Salzen prüfte ich in gleicher Weise, wie es für die Kolloide geschehen war,[2]) auch noch ihre Wirkung auf die urikolytische und urikopoietische Fähigkeit der Leberextrakte.

Um nicht über das Maß hinaus die Zahl der Experimente in den einzelnen Serien zu vermehren, suchte ich in einer ersten Versuchsreihe genau festzustellen, innerhalb welcher (wenn auch ziemlich weiten) Grenzen die verschiedenen Silbersalze, in äquimolekularer Lösung hinsichtlich des Silbergehaltes, eine günstige Wirkung auf die Autolyse ausübten.

Die Ergebnisse dieser einleitenden Experimente sind in den Tabellen I, II, III und IV wiedergegeben.

Die Technik war dieselbe wie sie in den früheren Arbeiten[3]) ausgeführt und beschrieben wurde.

---

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1907.

[2]) Diese Zeitschr. 10, 1908.

[3]) Diese Zeitschr. 13, 1909.

Für einige in Wasser unlösliche Salze benutzte ich als Lösungsmittel verdünnte Salzlösungen oder Säuren, doch stellte ich immer die so gewonnenen Resultate denen gegenüber, die bei Kontrollproben unter Zusatz von gleichen Mengen des angewendeten Lösungsmittels erhalten wurden.

Tabelle I.

Menge des Leberbreies g	Destilliertes H_2O ccm	Versuchsdauer in Std.	n/1000 zugesetzte Salzlösung ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g
50	400	—	—	—	0,138
50	400	72	—	—	0,220
50	395	—	5 $AgNO_3$	0,54	0,124
50	395	72	5 "	0,54	0,230
50	375	—	25 "	2,7	0,129
50	375	72	25 "	2,7	0,274
50	300	—	100 "	10,8	0,119
50	300	72	100 "	10,8	0,372
50	200	—	200 "	21,6	0,114
50	200	72	200 "	21,6	0,399
50	100	—	300 "	32,4	0,107
50	100	72	300 "	32,4	0,307
50	—	—	400 "	43,2	0,099
50	—	72	400 "	43,2	0,144
50	395	—	5 $AgClO_3$	0,54	0,119
50	395	72	5 "	0,54	0,289
50	375	—	25 "	2,7	0,112
50	375	72	25 "	2,7	0,392
50	300	—	100 "	10,8	0,129
50	300	72	100 "	10,8	0,234
50	200	—	200 "	21,6	0,119
50	200	72	200 "	21,6	0,273
50	100	—	300 "	32,4	0,098
50	100	72	300 "	32,4	0,140
50	—	—	400 "	43,2	0,099
50	—	72	400 "	43,2	0,094

Tabelle II.

Menge des Leberbreies g	Destilliertes H_2O ccm	Versuchsdauer in Std.	n/2000 zugesetzte Salzlösung ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g
50	400	—	—	—	0,208
50	400	72	—	—	0,541
50	395	—	5 Ag_2SO_4	0,54	0,213
50	395	72	5 "	0,54	0,558
50	375	—	25 "	2,7	0,207
50	375	72	25 "	2,7	0,638
50	300	—	100 "	10,8	0,214

Tabelle II (Fortsetzung).

Menge des Leberbreies g	Destilliertes H_2O ccm	Versuchsdauer in Std.	n/2000 zugesetzte Salzlösung ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g
50	300	72	100 Ag_2SO_4	10,8	0,619
50	200	—	200 "	21,6	0,205
50	200	72	200 "	21,6	0,574
50	100	—	300 "	32,4	0,190
50	100	72	300 "	32,4	0,419
50	—	—	400 "	43,2	0,119
50	—	72	400 "	43,2	0,174
50	395	—	5 $Ag_2C_2O_4$	0,54	0,219
50	395	72	5 "	0,54	0,568
50	375	—	25 "	2,7	0,213
50	375	72	25 "	2,7	0,610
50	300	—	100 "	10,8	0,207
50	300	72	100 "	10,8	0,614
50	200	—	200 "	21,6	0,198
50	200	72	200 "	21,6	0,849
50	100	—	300 "	32,4	0,189
50	100	72	300 "	32,4	0,894
50	—	—	400 "	43,2	0,154
50	—	72	400 "	43,2	0,270

Tabelle III.

Menge des Leberbreies g	Versuchsdauer in Std.	Destilliertes H_2O ccm	n/1000 zugesetzte Salzlösung ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g
50	—	400	—	—	0,175
50	72	400	—	—	0,301
50	—	399,5	Collargolum[1]) 0,5	0,054	0,183
50	72	399,5	" 0,5	0,054	0,319
50	—	395	" 5,0	0,54	0,205
50	72	395	" 5,0	0,54	0,345
50	—	350	" 50	5,4	0,245
50	72	350	" 50	5,4	0,363
50	—	300	" 100	10,8	0,219
50	72	300	" 100	10,8	0,238
50	—	200	" 200	21,6	0,194
50	72	200	" 200	21,6	0,207
50	—	399,5	Protargolum[2]) 0,5	0,054	0,180
50	72	399,5	" 0,5	0,054	0,309
50	—	395	" 5,0	0,54	0,187
50	72	395	" 5,0	0,54	0,324
50	—	350	" 50	5,4	0,212

[1]) 0,135 g Collargolum (Heyden) = 0,108 g Ag, in 1000 ccm destill. H_2O gelöst.

[2]) 1,35 g Protargolum = 0,108 g Ag, in 1000 ccm destill. H_2O gelöst.

Tabelle III (Fortsetzung).

Menge des Leberbreies g	Versuchsdauer in Std.	Destilliertes H_2O ccm	n/1000 zugesetzte Salzlösung ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g
50	72	350	Protargolum 50	5,4	0,282
50	—	300	„ 100	10,8	0,190
50	72	300	„ 100	10,8	0,185
50	—	200	„ 200	21,6	0,199
50	72	200	„ 200	21,6	0,214
50	—	350	$CH_3COO.Ag$ 50	5,4	0,187
50	72	350	„ 50	5,4	0,494
50	—	300	„ 100	10,8	0,193
50	72	300	„ 100	10,8	0,513

Tabelle IV.

72stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von

Destilliertem H_2O ccm	Zusatz von: $AgNO_3$ n/1000 ccm	Zusatz von: Ag-Hydrosol stabilisiert ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g
400[1]	—	—	—	0,098
400	—	—	—	0,207
200	$AgNO_3$ 200	—	21,6	0,358
300	„ 100	—	10,8	0,345
350	„ 50	—	5,4	0,249
375	„ 25	—	2,7	0,294
390	„ 10	—	1,08	0,280
395	„ 5	—	0,54	0,219
336	—	Ag Nr. 16[2])—64	21,76	0,398
368	—	„ 32	10,88	0,379
384	—	„ 16	5,44	0,290
392	—	„ 8	2,72	0,263
397	—	„ 3,2	1,09	0,211
399	—	„ 1,6	0,54	0,208

Wie aus den obigen Tabellen hervorgeht, ruft der Zusatz von geringsten Mengen der verschiedenen der Prüfung unterzogenen Silberverbindungen mit Ausnahme des Collargols und Protargols eine Vermehrung des nicht gerinnbaren Stickstoffes hervor. Die stufenweise Vermehrung der hinzugefügten Salzmenge läßt zunächst diese günstige Wirkung im allgemeinen noch

[1]) Kontrollprobe vor der Autolyse gekocht.

[2]) Ag Nr. 16 — stabilisiert — K = 0,037, Ag-Gehalt = 34 mg %.

mehr hervortreten.[1]) Sehr bald aber tritt ein Höhepunkt ein (der nicht identisch ist bei den einzelnen Salzen); über ihn hinaus zeigt sich die Steigerung weniger klar; schließlich bei noch größeren Dosen kommt es zur umgekehrten Wirkung, zur Abnahme des nicht gerinnbaren Stickstoffes.

* * *

Die weiteren Versuche, die das Verhalten der verschiedenen Fraktionen des nicht gerinnbaren Stickstoffes gegenüber wachsenden Dosen der verschiedenen Silbersalze aufklären sollen, sind in den Tabellen V bis XXII verzeichnet.

Die geprüften Salze sind die folgenden: Silber-Nitrat, -Nitrit, -Chlorat, -Acetat, -Carbonat, -Sulfat, -Phosphat, -Oxalat, -Borat, -Citrat, -Lactat, -Chlorid, Fluorid-, Thiosulfat-, Albuminat; Kaliumsilbercyanid, phenolsulfonsaures Silber.

Die Technik dieser Versuche ist gleich der in einer früheren Mitteilung über die Wirkung der metallischen Hydrosole auf die Leberautolyse berichteten.[2])

Tabelle V.

72stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertes H_2O ccm	$^n/_{1000}$ $AgNO_3$ ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
400[3])	—	—	0,398	0,230	0,014	0,043	0,111
400	—	—	0,615	0,402	0,041	0,018	0,154
395	5	0,54	0,719	0,467	0,051	0,017	0,184
390	10	1,08	0,776	0,563	0,041	0,021	0,151
375	25	2,7	0,866	0,595	0,060	0,026	0,184

[1]) Die genaue Analyse der Tabellen zeigt hier und dort Schwankungen, die diesen aufsteigenden Ast der Wirkungskurve beeinflussen. Doch verwirren sie nicht die Grundzüge des Bildes; es mag deshalb genügen, ihrer Erwähnung getan zu haben, ohne die Beziehungen zu erläutern, die sie zu den unregelmäßigen schon in bezug auf die biochemische Wirkung andrer Ionen und Kolloide beschriebenen Kurven haben könnten (vgl. Michaelis in Koranyi-Richter, Physik. Chem. und Med. 369, 424 usw.).

[2]) Diese Zeitschr. l. c.

[3]) Kontrollprobe vorher gekocht.

Tabelle V (Fortsetzung).

Destilliertes H_2O ccm	$^n/_{1000}$ $AgNO_3$ ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
350	50	5,4	0,714	0,493	0,058	0,013	0,150
300	100	10,8	0,999	0,685	0,063	0,022	0,229
200	200	21,6	1,056	0,735	0,072	0,021	0,228
100	300	32,4	0,814	0,584	0,037	0,034	0,159
—	400	43,2	0,370	0,228	0,019	0,040	0,083

Tabelle VI.

72 stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertes H_2O ccm	$^n/_{1000}$ $AgNO_3$ ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
400 [1])	—	—	0,284	0,128	0,032	0,059	0,065
400	—	—	0,592	0,298	0,065	0,047	0,182
395	5	0,54	0,567	0,329	0,059	0,049	0,130
390	10	1,08	0,652	0,399	0,065	0,042	0,145
375	25	2,7	0,744	0,446	0,128	0,031	0,139
350	50	5,4	0,758	0,519	0,127	0,051	0,061
300	100	10,8	0,624	0,400	0,046	0,055	0,123
200	200	21,6	0,786	0,519	0,033	0,054	0,180
100	300	32,4	0,521	0,277	0,035	0,054	0,155
—	400	43,2	0,322	0,196	0,030	0,057	0,039

Tabelle VII.

72 stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertes H_2O ccm	$^n/_{1000}$ $AgClO_3$ ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
400 [1])	—	—	0,213	0,101	0,030	0,049	0,033
400	—	—	0,459	0,273	0,105	0,025	0,056
395	5	0,54	0,533	0,336	0,123	0,025	0,049
390	10	1,08	0,519	0,291	0,136	0,017	0,075
375	25	2,7	0,554	0,299	0,120	0,028	0,107
350	50	5,4	0,421	0,280	0,074	0,028	0,039
300	100	10,8	0,473	0,305	0,084	0,035	0,049
200	200	21,6	0,383	0,202	0,061	0,049	0,071
100	300	32,4	0,307	0,144	0,033	0,042	0,088
—	400	43,2	0,283	0,128	0,034	0,040	0,081

[1]) Kontrollprobe vorher gekocht.

Tabelle VIII.

72 stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O	$^n/_{1000}$ $CH_3 \cdot COOAg$	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	mg	g	g	g	g	g
400 [1]	—	—	0,551	0,269	0,026	0,051	0,205
400	—	—	0,932	0,579	0,061	0,021	0,272
395	5	0,54	0,919	0,568	0,057	0,021	0,273
390	10	1,08	1,045	0,650	0,078	0,021	0,296
375	25	2,7	1,081	0,807	0,026	0,023	0,125
350	50	5,4	1,024	0,652	0,070	0,015	0,287
300	100	10,8	1,130	0,855	0,054	0,029	0,192
200	200	21,6	0,982	0,610	0,049	0,028	0,295
100	300	32,4	0,697	0,505	0,042	0,041	0,109
—	400	43,2	0,491	0,273	0,028	0,049	0,141

Tabelle IX.

72 stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O	$^n/_{2000}$ Ag_2CO_3	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	mg	g	g	g	g	g
400 [1]	—	—	0,261	0,138	0,031	0,061	0,031
400	—	—	0,567	0,305	0,070	0,050	0,142
395	5	0,54	0,582	0,329	0,071	0,055	0,137
390	10	1,08	0,640	0,401	0,111	0,049	0,079
375	25	2,7	0,683	0,423	0,205	0,044	0,011
350	50	5,4	0,849	0,521	0,189	0,035	0,104
300	100	10,8	0,821	0,482	0,100	0,030	0,209
200	200	21,6	0,709	0,346	0,053	0,053	0,257
100	300	32,4	0,684	0,321	0,062	0,055	0,246
—	400	43,2	0,476	0,225	0,039	0,059	0,153

Tabelle X.

72 stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O	$^n/_{2000}$ Ag_2SO_4	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	mg	g	g	g	g	g
400 [1]	—	—	0,184	0,098	0,012	0,037	0,037
400	—	—	0,319	0,135	0,079	0,027	0,078
395	5	0,54	0,337	0,211	0,069	0,025	0,032

[1]) Kontrollprobe vorher gekocht.

Tabelle X (Fortsetzung).

Destilliertem H_2O ccm	$^n/_{2000}$ Ag_2SO_4 ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
390	10	1,08	0,398	0,237	0,092	0,024	0,045
375	25	2,7	0,600	0,362	0,162	0,033	0,043
350	50	5,4	0,372	0,218	0,079	0,029	0,046
300	100	10,8	0,347	0,196	0,095	0,033	0,023
200	200	21,6	0,399	0,207	0,074	0,034	0,084
100	300	32,4	0,219	0,117	0,032	0,030	0,040
—	400	43,2	0,173	0,069	0,020	0,031	0,053

Tabelle XI.

72 stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

2% HNO_3-Lösg. ccm	$^n/_{3000}$ Ag_3PO_4 [1]) ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
400 [2])	—	—	0,261	0,138	0,030	0,058	0,035
400	—	—	0,501	0,275	0,061	0,047	0,118
395	5	0,54	0,484	0,262	0,056	0,042	0,124
390	10	1,08	0,564	0,291	0,062	0,045	0,166
375	25	2,7	0,650	0,355	0,100	0,032	0,163
350	50	5,4	0,856	0,479	0,131	0,034	0,212
300	100	10,8	1,158	0,635	0,070	0,052	0,401
200	200	21,6	0,961	0,591	0,048	0,047	0,275
100	300	32,4	0,451	0,193	0,039	0,057	0,162
—	400	43,2	0,256	0,134	0,029	0,056	0,037
400 [3])	—	—	0,488	0,274	0,060	0,041	0,113

Tabelle XII.

72 stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O ccm	$^n/_{2000}$ $Ag_2C_2O_4$ ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
400 [4])	—	—	0,277	0,114	0,041	0,070	0,052
400	—	—	0,567	0,278	0,080	0,059	0,150
395	5	0,54	0,574	0,289	0,077	0,056	0,152

[1]) In 2% HNO_3-Lösung gelöst.
[2]) Kontrollprobe vorher gekocht.
[3]) Destilliertes H_2O.
[4]) Kontrollprobe vorher gekocht.

Tabelle XII (Fortsetzung).

Destilliertem H_2O	$^n/_{2000}$ $Ag_2C_2O_4$	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	mg	g	g	g	g	g
390	10	1,08	0,631	0,343	0,087	0,062	0,139
375	25	2,7	0,673	0,379	0,091	0,051	0,152
350	50	5,4	0,828	0,470	0,151	0,049	0,158
300	100	10,8	0,884	0,498	0,189	0,062	0,135
200	200	21,6	0,975	0,515	0,167	0,061	0,232
100	300	32,4	0,985	0,512	0,133	0,067	0,273
—	400	43,2	0,454	0,214	0,126	0,065	0,049

Tabelle XIII.

72stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O	$^n/_{1000}$ BO_2Ag	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	mg	g	g	g	g	g
400[1])	—	—	0,287	0,148	0,032	0,058	0,047
400	—	—	0,612	0,325	0,061	0,031	0,195
395	5	0,54	0,574	0,302	0,057	0,033	0,182
390	10	1,08	0,626	0,334	0,066	0,028	0,198
375	25	2,7	0,624	0,364	0,094	0,018	0,148
350	50	5,4	0,772	0,471	0,087	0,027	0,217
300	100	10,8	0,709	0,424	0,067	0,034	0,184
200	200	21,6	0,863	0,493	0,061	0,032	0,277
100	300	32,4	0,699	0,346	0,043	0,041	0,269
—	400	43,2	0,391	0,183	0,031	0,050	0,127

Tabelle XIV.

72stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O	$^n/_{3000}$ $Ag_3C_6H_5O_7$	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	ccm	g	g	g	g	g
400[1])	—	—	0,285	0,136	0,029	0,047	0,073
400	—	—	0,621	0,301	0,065	0,026	0,229
395	5	0,54	0,687	0,406	0,063	0,021	0,197
390	10	1,08	0,744	0,477	0,069	0,019	0,179
375	25	2,7	0,855	0,602	0,071	0,027	0,155
350	50	5,4	0,849	0,606	0,064	0,031	0,148
300	100	10,8	0,856	0,682	0,068	0,028	0,078
200	200	21,6	0,709	0,309	0,057	0,037	0,306
100	300	32,4	0,740	0,450	0,034	0,032	0,224
—	400	43,2	0,414	0,280	0,027	0,041	0,066

[1]) Kontrollprobe vorher gekocht.

Tabelle XV.

72 stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O	$^n/_{1000}$ $C_6H_4(OH)SO_3Ag$	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	mg	g	g	g	g	g
400[1]	—	—	0,219	0,122	0,016	0,054	0,027
400	—	—	0,550	0,280	0,063	0,030	0,177
395	5	1,54	0,539	0,276	0,064	0,026	0,173
390	10	1,08	0,579	0,337	0,068	0,021	0,153
375	25	2,7	0,610	0,343	0,070	0,021	0,176
350	50	5,4	0,814	0,459	0,077	0,018	0,260
300	100	10,8	0,693	0,484	0,068	0,029	0,119
200	200	21,6	0,617	0,368	0,066	0,034	0,149
100	300	32,4	0,421	0,190	0,030	0,041	0,160
—	400	43,2	0,308	0,140	0,021	0,050	0,097

Tabelle XVI.

72 stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O	$^n/_{1000}$ $C_3H_5O_3Ag$	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	mg	g	g	g	g	g
400[1]	—	—	0,381	0,195	0,027	0,063	0,096
400	—	—	0,612	0,347	0,122	0,050	0,093
395	5	0,54	0,680	0,355	0,150	0,049	0,126
390	10	1,08	0,723	0,430	0,134	0,051	0,108
375	25	2,7	0,975	0,522	0,261	0,044	0,148
350	50	5,4	0,921	0,497	0,289	0,040	0,095
300	100	10,8	0.863	0,530	0,210	0,048	0,075
200	200	21,6	0,954	0,500	0,234	0,051	0,169
100	300	32,4	0,807	0,473	0,134	0,047	0,153
—	400	43,2	0,855	0,485	0,115	0,057	0,198

Tabelle XVII.

72 stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

0,85 % NaCl-Lösg.	$^n/_{1000}$ AgCl[2])	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	mg	g	g	g	g	g
400[1]	—	—	0,250	0,120	0,028	0,058	0,044
400	—	—	0,501	0,210	0,057	0,029	0,205
395	5	0,54	0,489	0,216	0,060	0,028	0,185

[1]) Kontrollprobe vor der Autolyse gekocht.

[2]) In 0,85 % NaCl-Lösung gelöst.

Tabelle XVII (Fortsetzung).

0,85 % NaCl-Lösg.	n/1000 AgCl	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	mg	g	g	g	g	g
390	10	1,08	0,515	0,227	0,056	0,026	0,206
375	25	2,7	0,555	0,202	0,071	0,024	0,258
350	30	5,4	0,515	0,217	0,119	0,018	0,161
300	100	10,8	0,558	0,245	0,057	0,029	0,227
200	200	21,6	0,599	0,336	0,051	0,031	0,181
100	300	32,4	0,471	0,197	0,053	0,049	0,172
—	400	43,2	0,455	0,235	0,048	0,049	0,123

Tabelle XVIII.

72stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

1 % Na_2SO_3-Lösung	n/1000 AgBr[1])	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	mg	g	g	g	g	g
400[2])	—	—	0,190	0,095	0,011	0,057	0,027
400	—	—	0,307	0,157	0,062	0,044	0,044
395	5	0,54	0,343	0,174	0,061	0,042	0,066
390	10	1,8	0,352	0,196	0,066	0,042	0,048
375	25	2,7	0,407	0,209	0,100	0,035	0,063
350	50	5,4	0,322	0,168	0,077	0,032	0,045
300	100	10,8	0,355	0,163	0,108	0,049	0,035
200	200	21,6	0,494	0,271	0,052	0,051	0,120
100	300	32,4	0,261	0,136	0,049	0,055	0,021
—	400	43,2	0,227	0,119	0,037	0,054	0,017
400[3])	—	—	0,339	0,162	0,058	0,042	0,087

Tabelle XIX.

72stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O	n/1000 AgFl	Ag-Gehalt	Gesamt-N	Monoaminosäuren-N	Purinbasen-N	Albumosen-N	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N
ccm	ccm	mg	g	g	g	g	g
400[2])	—	—	0,282	0,138	0,027	0,058	0,059
400	—	—	0,534	0,289	0,079	0,048	0,118
395	5	0,54	0,470	0,283	0,075	0,042	0,070

[1]) In 1 % Na_2SO_3-Lösung gelöst.
[2]) Kontrollprobe vor der Autolyse gekocht.
[3]) Destilliertes H_2O.

Tabelle XIX (Fortsetzung).

Destilliertem H_2O ccm	n/1000 AgJl ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
390	10	1,08	0,617	0,343	0,110	0,036	0,128
375	25	2,7	0,687	0,449	0,135	0,035	0,068
350	50	5,4	0,765	0,484	0,084	0,054	0,138
300	100	10,8	0,633	0,346	0,073	0,054	0,160
200	200	21,6	0,947	0,593	0,056	0,055	0,243
100	300	32,4	0,424	0,247	0,028	0,051	0,098
—	400	43,2	0,273	0,127	0,021	0,062	0,063

Tabelle XX.

72stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O ccm	n/1000 $KAg(CN)_2$ ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
400[1])	—	—	0,381	0,195	0,027	0,063	0,096
400	—	—	0,612	0,347	0,122	0,050	0,093
395	5	0,54	0,849	0,494	0,148	0,044	0,163
390	10	1,08	0,835	0,472	0,162	0,042	0,159
375	25	2,7	0,673	0,352	0,140	0,050	0,131
350	50	5,4	0,800	0,493	0,195	0,041	0,071
300	100	10,8	0,933	0,558	0,174	0,047	0,154
200	200	21,6	0,564	0,297	0,135	0,055	0,077
100	300	32,4	0,425	0,219	0,088	0,056	0,062
—	400	43,2	0,398	0,195	0,030	0,055	0,118

Tabelle XXI.

72stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O ccm	n/1000 Silberthiosulfat ccm	Ag-Gehalt mg	1,5/1000 n Na_2SO_3 ccm	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
400[1])	—	—	—	0,214	0,101	0,024	0,040	0,049
400	—	—	—	0,519	0,310	0,094	0,028	0,087
395	5	0,54	—	0,533	0,310	0,127	0,013	0,083
390	10	1,08	—	0,529	0,293	0,120	0,017	0,099
375	25	2,7	—	0,613	0,350	0,140	0,009	0,114
350	50	5,4	—	0,644	0,324	0,152	0,034	0,134
300	100	10,8	—	0,732	0,475	0,111	0,023	0,123

[1]) Kontrollprobe vorher gekocht.

Tabelle XXI (Fortsetzung).

Destilliertem H_2O ccm	n/1000 Silberthiosulfat ccm	Ag-Gehalt g	1,5/1000 n Na_2SO_3 ccm	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
200	200	21,6	—	0,713	0,401	0,100	0,043	0,169
100	300	32,4	—	0,744	0,444	0,094	0,013	0,193
—	400	43,2	—	0,523	0,406	0,099	0,009	0,209
395	—	—	5	0,498	—	—	—	—
390	—	—	10	0,503	—	—	—	—
375	—	—	25	0,530	—	—	—	—
350	—	—	50	0,490	—	—	—	—
300	—	—	100	0,501	—	—	—	—
200	—	—	200	0,519	—	—	—	—
100	—	—	300	0,512	—	—	—	—
—	—	—	400	0,507	—	—	—	—

Tabelle XXII.

72stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O ccm	Silberalbuminat ccm	Ag-Gehalt mg	20‰ Albuminlösung ccm	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
400[1]	—	—	—	0,214	0,101	0,024	0,040	0,049
400	—	—	—	0,519	0,310	0,094	0,028	0,087
395	5	0,54	—	0,560	0,327	0,119	0,021	0,093
390	10	1,08	—	0,614	0,335	0,158	0,014	0,107
375	25	2,7	—	0,607	0,364	0,112	0,019	0,112
350	50	5,4	—	0,712	0,461	0,144	0,013	0,094
300	100	10,8	—	0,590	0,279	0,180	0,032	0,099
200	200	21,6	—	0,598	0,342	0,101	0,038	0,117
100	300	32,4	—	0,613	0,343	0,107	0,031	0,132
—	400	43,2	—	0,643	0,335	0,090	0,034	0,184
395	—	—	5	0,530	—	—	—	—
390	—	—	10	0,544	—	—	—	—
375	—	—	25	0,582	—	—	—	—
350	—	—	50	0,607	—	—	—	—
300	—	—	100	0,628	—	—	—	—
200	—	—	200	0,696	—	—	—	—
100	—	—	300	0,714	—	—	—	—
—	—	—	400	0,749	—	—	—	—

Die erhaltenen Werte zeigen eine bemerkenswerte Vermehrung der Purinbasen. Die Vermehrung findet stets statt bei allen Salzen, die auf die Gesamtautolyse wirken. Wie diese hat auch die Bildung der Purinbasen ihr Optimum. Dieses

[1]) Kontrollprobe vorher gekocht.

entspricht verschiedenen Metallmengen je nach der benutzten Verbindung; sie stimmen aber nicht mit dem Optimum für die Gesamtautolyse überein. Über die Maxima hinaus reduziert die Hinzufügung von Silberverbindungen von neuem die Menge der Purinbasen bis zu normalen und subnormalen Verhältnissen.

Die Monoaminosäuren verhalten sich wie der Gesamtstickstoff. Der Albumosenstickstoff läßt sich leicht durch kleine Dosen von Silberverbindungen reduzieren; die Reduktion ist verschieden je nach den Verbindungen und im allgemeinen von unbeständigem Verhalten. In größeren Mengen rufen die Silberverbindungen dagegen eine mäßige Vermehrung der Albumosen nach der Autolyse hervor.

* * *

In den Tabellen XXIII bis XXV ist über einige Experimente berichtet, die mit Leberextrakten ausgeführt wurden, um die Wirkung des Silbernitrats, Citrats und Acetats auf die Urikolyse und Urikopoiese zu ergründen. Die Technik für diese Versuche ist die von Wiener, Burian, Schittenhelm angewendete und ausführlich in einer früheren Mitteilung beschrieben.[1])

Tabelle XXIII.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Std.[2])	n/1000 zugesetzte Salzlösung ccm	Ag-Gehalt mg	Destilliertes Wasser ccm	Ū mg
500 g + 1000 ccm destilliertes Wasser	270	6	—	—	100	17,9
	270	6	$AgNO_3$ 100	10,8	—	28,5
	270	6	„ 25	2,7	75	32,4
	270	6	„ 10	1,08	90	37,1
	270	6	„ 5	0,54	95	23,9

Die Harnsäure wurde nach der Methode Ludwig-Salkowski dosiert. Wie aus den Tabellen XXIII, XXIV und XXV hervorgeht, nimmt die Bildung von Harnsäure, die in den Leberextrakten stattfindet, schon durch Hinzufügung sehr geringer Mengen der verschiedenen Silbersalze zu; in der Folge behauptet sich nach Hinzufügung größerer Dosen die günstige

[1]) Diese Zeitschr. 10, 1908.

[2]) Alle Proben wurden während der Versuchszeit mit Motor im Thermostaten stark geschüttelt.

Wirkung; sie wird sogar noch etwas deutlicher; jedoch sind die Proportionen dieser weiteren Vermehrung, in absoluter Zahl ausgedrückt, sehr bescheiden.

Tabelle XXIV.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Std.[1]	n/1000 zugesetzte Salzlösung ccm		Ag-Gehalt mg	Destilliertes Wasser ccm	Ū mg
2000 g + 5000 ccm destilliertes Wasser	400	10	—		—	400	13,5
	400	10	$AgNO_3$	10	1,08	390	32,9
	400	10	„	100	10,8	300	27,5
	400	10	„	400	43,2	—	34,0
	400	10	Ag_2SO_4	2,5	0,54	397,5	29,2
	400	10	„	5	1,08	395	30,7
	400	10	„	12,5	2,7	387,5	24,9
	400	10	„	50	10,8	350	33,5
	400	10	„	100	21,6	300	38,7
	400	10	„	200	43,2	200	30,4
	400	10	$CH_3.COOAg$	5	0,54	395	20,1
	400	10	„	10	1,8	390	23,3
	400	10	„	25	2,7	375	22,7
	400	10	„	100	10,8	300	39,5
	400	10	„	400	43,2	—	40,3

Tabelle XXV.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Std.[1]	n/2000 zugesetzte Salzlösung ccm		Ag-Gehalt mg	Destilliertes Wasser ccm	Ū mg
500 g + 1500 ccm destilliertes Wasser	250	6	—		—	400	22,4
	250	6	$Ag_3C_6H_5O_7$	5	0,54	395	34,5
	250	6	„	10	1,08	390	38,9
	250	6	„	25	2,7	375	32,3
	250	6	„	100	10,8	300	45,7
	250	6	„	200	21,6	200	33,9
	250	6	„	400	43,2	—	40,1

Der urikolytische Prozeß dagegen (s. Tab. XXVI und XXVII) wird nur von kleinen Dosen der verschiedenen Silbersalze begünstigt; die mittleren und starken Dosen verhindern statt dessen die Zerstörung der Harnsäure.

* * *

In einer weiteren Versuchsreihe haben wir ferner nachzuforschen gesucht, ob die günstige Wirkung der Silbersalze auf

[1]) Alle Proben wurden während der Versuchszeit mit Motor im Thermostaten stark geschüttelt.

die Autolyse durch die Gegenwart gewisser Substanzen, wie CO, HNO_3, KCN[1]), wie es bei dem Silberkolloid der Fall war, verhindert oder verzögert wurde. Die ausgeübte Technik ist die bei Gelegenheit der Experimente mit dem Hydrosol des Silbers auseinandergesetzte[2]); die Zeit des Kontaktes der $AgNO_3$-Lösung mit dem Gift betrug 15 Minuten.

Tabelle XXVI.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Std.[3])	n/1000 zugesetzte Salzlösung ccm	Ag-Gehalt mg	Destilliertes Wasser ccm	Zusatz	$\overline{\text{U}}$ mg
1500 g + 3000 ccm destilliertes H_2O	270	10	—	—	100	Ungefähr 125 mg harnsaures Natrium in 3 ccm n/1-NaOH gelöst, auf 25 ccm aufgefüllt — entsprechend 100 mg $\overline{\text{U}}$	42
	270	10	$AgNO_3$ 5	0,54	95		19
	270	10	„ 10	1,08	90		27
	270	10	„ 25	2,7	75		64,5
	270	10	„ 100	10,8	—		61
	270	10	Ag_2SO_4 2,5	0,54	97,5		29
	270	10	„ 5	1,08	95		37
	270	10	„ 12,5	2,7	87,5		88
	270	10	„ 50	10,8	50		75
	270	10	$CH_3.COO.Ag$ 5	0,54	95		32
	270	10	„ 10	1,08	90		27
	270	10	„ 25	2,7	75		74
	270	10	„ 100	10,8	—		90

Tabelle XXVII.

Menge des Leberbreies	Kolatur ccm	Versuchsdauer Std.[3])	n/3000 zugesetzte Salzlösung ccm	Ag-Gehalt mg	Destilliertes Wasser ccm	Zusatz	$\overline{\text{U}}$ mg
1000 g + 2000 ccm destilliertes H_2O	200	6	—	—	600	Ungefähr 125 mg harnsaures Natrium in 3 ccm n/1-NaOH gelöst, auf 25 ccm aufgefüllt — entsprechend 99 mg $\overline{\text{U}}$	51
	200	6	$AgNO_3$ 5	0,18	595		18,4
	200	6	„ 30	1,08	570		38,2
	200	6	„ 75	2,7	525		89
	200	6	„ 600	21,6	—		84
	200	6	„ n/1000 600	64,8	—		90,5
	200	6	$Ag_3C_6H_5O_7$ 5	0,54	595		29,0
	200	6	„ 10	1,08	590		30,0
	200	6	„ 25	2,7	575		69,0
	200	6	„ 100	10,8	500		85
	200	6	„ 600	21,6	—		80

[1]) Andere ebenfalls auf das Hydrosol wirkende Gifte, wie J, Hg, HCN, wurden nicht angewendet, weil sie mit den Silbersalzen einen unlöslichen Niederschlag bilden.

[2]) Diese Zeitschr. 7, 1907.

[3]) Luftstromdurchleitung.

Tabelle XXVIII.

72stündige Autolyse von 50 g Leberbrei bei Zusatz von:

Destilliertem H_2O ccm	n/1000 zugesetzte $AgNO_3$-Lösung ccm	Art des Giftes	Verdünnung desselben in Litern pro g-mol	Gesamt-N g
400[1])	—	—	—	0,126
400	—	—	—	0,219
300	100	—	—	0,329
200	—	CO	gesättigt	0,240
300	100	"	"	0,347
400	—	HNO_3	4000	0,230
300	100	"	4000	0,327
400	—	"	400	0,224
300	100	"	400	0,348
400	—	KCN	100000	0,209
300	100	"	100000	0,341
400	—	"	1000	0,231
300	100	"	1000	0,328

Wie aus der Tabelle XXVIII hervorgeht, üben die angewandten Substanzen keinerlei Wirkung auf den Gang der durch die Silbersalze veranlaßten Autolyse aus.

Wenn wir die Ergebnisse der ausgeführten Versuche zusammenfassen, ergibt sich folgendes:

1. Die Leberautolyse wird gesteigert durch kleine Mengen von Silber-Nitrat, -Nitrit, -Chlorat, -Acetat, -Carbonat, -Sulfat, -Phosphat, -Oxalat, -Borat, -Citrat, -Lactat, -Chlorid, -Fluorid, -Thiosulfat, -Albuminat, Kaliumsilbercyanid, phenolsulfonsaures Silber, verhindert durch große Mengen derselben Salze.

2. Kleine Mengen der verschiedenen Salze begünstigen sehr die Bildung der Purinbasen und drücken etwas die Albumosenmenge herab.

3. Die Urikopoiese wird begünstigt durch die Gegenwart von Silbersulfat, -Acetat, -Nitrat, -Citrat, auch bei gesteigerten Dosen.

4. Die Urikolyse wird gesteigert durch kleine Dosen von Silber-Sulfat, -Acetat, -Nitrat, -Citrat, verhindert durch größere Dosen.

5. Spuren von KCN, HNO_3 und CO haben keinerlei Wirkung auf den Verlauf der durch Silbernitrat hervorgerufenen Leberautolyse.

[1]) Kontrollprobe.

Über den Einfluß von Silber-Hydrosolen und -Salzen auf den Stickstoffumsatz.

Von

Guido Izar.

(Aus dem Institute für spezielle Pathologie innerer Krankheiten der k. Universität Pavia.)

(*Eingegangen am 13. Juli 1909.*)

In einer jüngst erschienenen Arbeit[1]) wurde nachgewiesen, daß Silbersalze auf die Autolyse eine ähnliche Wirkung ausüben, wie sie das entsprechende Hydrosol entfaltet. Diese Beobachtungen gaben uns Veranlassung, unsere Untersuchungen auf die Silbersalze auszudehnen und zu erforschen, welche Wirkung diese auf den lebenden Organismus ausüben, ähnlich wie es für das Hydrosol geschehen war.[2])

Dazu wurden wir des weiteren auch durch die Spärlichkeit der Angaben veranlaßt, welche über diesen Gegenstand vorliegen.

Es wurden bisher unter den Schwermetallen nur wenige in bezug auf ihren Einfluß auf den Stoffwechsel untersucht, und diese Untersuchungen betreffen hauptsächlich das Blei, Quecksilber, Eisen und Mangan, während die bisher gesammelten Notizen über die übrigen Schwermetalle spärlich und widersprechend sind.

Was speziell das Silber anbelangt, so liegt, soweit ich der mir zugänglichen Literatur entnehmen konnte, eine wirkliche Lücke vor: es haben zwar zahlreiche Autoren Untersuchungen über die biologischen Eigenschaften dieses Metalles ausgeführt, indem seine antiseptischen Eigenschaften, das bactericide Vermögen und die Giftigkeit geprüft wurden, es wurde aber unterlassen, den Einfluß auf den Stoffwechsel zu prüfen.

---

[1]) Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908; diese Zeitschr. 1909.

[2]) Diese Zeitschr. 5; Berl. klin. Wochenschr. 1907.

Die von uns vorgenommenen Untersuchungen verfolgten den Zweck, festzustellen:

1. welchen Einfluß das kolloidale Silber und die Silbersalze auf die Stickstoffbilanz ausüben;

2. wie es die Verteilung der Stickstoffschlacken im Harne beeinflußt.

Technik.

Zu diesen Untersuchungen verwendete ich Hündinnen[1]), denen äußerer Umstände halber[2]) der N. recurrens durchschnitten worden war.

Vor der Operation bestimmte ich die zur normalen Ernährung der einzelnen Versuchstiere nötige tägliche Nahrungsmenge, welche bereits während der Heilungsperiode der operativen Wunde täglich verabreicht wurde.

Die Schwierigkeit, konstant eine Kost mit gleichem Stickstoffgehalt zu erhalten, veranlaßte mich, nach verschiedenen Versuchen, eine reine Brotdiät (Brot aus Weizen- und Roggenmehl) heranzuziehen. Das Brot wurde von einem und demselben Bäcker einmal wöchentlich geliefert, und, um eventuelle Verluste durch Austrocknen zu vermeiden, sofort in gleiche Teile, entsprechend der täglichen Dosis für die einzelnen Tiere verteilt.

Vor der Fütterung wurde das Brot in einer Schale zerkleinert und mit einer bestimmten Menge lauwarmer 0,85 %iger Kochsalzlösung eingeweicht.

Aus der mehrmals, jedesmal doppelt, nach Kjeldhal ausgeführten Bestimmung des Stickstoffgehaltes im dargereichten Brot (wobei stets genau gewogene Mengen des nach derselben Methode, wie bei Ermittelung des N-Gehaltes der Faeces erhaltenen Pulvers angewendet wurden) ergaben sich, wie aus Tabelle I ersichtlich ist, nur geringe Schwankungen der N-Menge.

Tabelle I.

Datum	Brot nicht getrocknet g	Brot getrocknet g	N g	N % Brot g	
16. X.	100	71,990	1,308	1,308	Mittelwert 1,345 % N im Brot
3. XI.	50	33,133	0,671	1,342	
30. XII.	50	35,019	0,662	1,324	
30. I.	50	36,842	0,692	1,384	
20. II.	50	37,312	0,6845	1,369	
19. III.	50	34,419	0,671	1,342	

[1]) Ich zog die Weibchen vor, weil bei diesen das Kathetirisieren leichter ausgeführt werden kann.

[2]) Um uns eine strengere Beaufsichtigung und Kontrolle zu sichern. hielten wir die Tiere in einem Lokal unseres Institutes, welches einen Teil des St. Matthäus-Spitals bildet.

Als Maßstab des eingeführten Stickstoffs habe ich die Durchschnittszahl der obigen Werte genommen und daraus die Gesamtmenge des mit dem Brote eingeführten Stickstoffs berechnet.

Bei jedem Tier wurde die Versuchsperiode begonnen, wenn, nach Ausheilung der Wunde, das Stickstoffgleichgewicht erreicht war.

Um die den verschiedenen Perioden zugehörenden Kotmengen voneinander zu trennen, wurde den Tieren Carminpulver verabreicht. Da es sich darum handelte, die sich voraussichtlich innerhalb weniger Tage entfaltende Wirkung von direkt in den Blutkreislauf eingeführten Stoffen zu untersuchen, wurde der Kotstickstoff in zwei verschiedenen Perioden zugehörenden Faeces getrennt bestimmt, von welchen die eine 4 bis 5 Tage nach der Einspritzung geschlossen wurde, während die zweite offen gehalten wurde, so lange, bis sich wieder das Stickstoffgleichgewicht eingestellt hatte.

Der Stickstoffgehalt der Faeces wurde in folgender Weise bestimmt: Alle zu einer Periode gehörenden und in Porzellanschalen gesammelten Faeces wurden auf dem Wasserbade getrocknet, in einem Mörser fein zerrieben, 4 Stunden im Trockenschrank bei 100° getrocknet und dann 48 Stunden in den Exsiocator über Schwefelsäure gestellt: von dem so erhaltenen und gewogenen Pulver wurden noch zwei Proben von bestimmten Gewicht entnommen und nach Kjeldhal auf ihren Stickstoffgehalt untersucht.

Jeden Morgen wurde zur selben Stunde der Harn gesammelt und das Tier katheterisiert. Die Harnmenge wurde gemessen und, der Einfachheit der Rechnung halber, durch Zusatz von destilliertem Wasser auf 1000 ccm gebracht und filtriert.

In derselben wurden bestimmt:

1. der Gesamtstickstoff, nach Kjeldhal, in doppelten Proben,
2. der Harnstoff-N nach Mörner Siöqvist-Bödtker.
3. die Harnsäure nach Ludwig Salkowski,

Um festzustellen, ob die in den Kreislauf eingeführten Stoffe nicht das Nierenparenchym veränderten, prüfte ich täglich den Harn auf Eiweiß und Albumosen, und untersuchte auch am Ende jeder Periode das durch Zentrifugieren erhaltene Sediment.

Bei der Hündin Nr. 1 war der diesbezügliche Befund stets negativ; bei der Hündin Nr. 2 konnte ich dagegen zweimal (s. Tabellen) das Auftreten einer Cystitis nachweisen, welche wahrscheinlich auf das bei diesem Tier ziemlich schwierige Katheterisieren zurückzuführen war.

Diese Störungen konnten jedoch in beiden Fällen dadurch beseitigt werden, daß das Tier 5 bis 6 Tage in Ruhe gelassen wurde. Um aber eventuelle durch eine Beeinflussung des Stoffwechsels seitens des krankhaften Zustandes des Tieres herbeigeführte Änderungen der Resultate der eben vor 2 Tagen geschlossenen Versuchsperiode auszuschalten und die daraus folgenden Fehlerquellen zu beseitigen, wurde nach einer Vorbereitungsmethode der Versuch wiederholt; die Resultate bestätigten die früheren.

Bezüglich der Zuverlässigkeit der erhaltenen Resultate mag hervorgehoben werden, daß die Tiere während der ziemlich langen Versuchsperioden ein fast vollständiges Gleichgewicht ihres Körpergewichts und ihres Ernährungszustandes gezeigt haben. Dementsprechend wurde auch eine befriedigende Stickstoffbilanz erhalten, mit einer Schwankung von 4% bei dem einen und von nur 1% bei dem anderen Tier, so daß die Resultate vollständig den Anforderungen unserer Untersuchungen genügten, bei welchen die experimentell herbeigeführten Abweichungen sich auf ein Vielfaches dieser Zahlen belaufen.

Die zu unseren Versuchen angewendeten Hydrosole wurden von mir selbst nach Bredigs Verfahren hergestellt: einige von ihnen wurden als solche wenige Stunden nach ihrer Herstellung[1]) (12 Stunden) eingespritzt: andere wurden dagegen vor dem Gebrauch durch Zusatz von mehrere Tage dialysierter Merckscher Gelatine im Verhältnis von 0,03% stabilisiert. Von jedem Hydrosol wurde das katalytische Vermögen und der Metallgehalt bestimmt.

Die Salzlösungen wurden jedesmal durch Verdünnung einer konzentrierten und im Dunklen aufbewahrten Stammlösung bereitet.

Die Flüssigkeit wurde langsam in die V. jugularis eingespritzt, nachdem eine Schlinge am Halse angebracht worden war. In keinem Falle wurden bei den behandelten Tieren Störungen irgendwelcher Art beobachtet.

I. Wirkung auf den N-Umsatz.[2])

In den Tabellen II und III sind die erhaltenen Resultate zusammengestellt. Aus denselben geht hervor, daß in bezug auf die Wirkung des kolloidalen Silbers die Resultate nicht von denjenigen verschieden sind, welche wir bei den erwähnten Versuchen am Menschen erhalten hatten und welche von Filippi und Rodolico[3]) am Kaninchen bestätigt werden.

---

[1]) Bei Einhaltung der in den früheren Arbeiten angegebenen Maßregeln habe ich nie, selbst nicht nach 5 bis 6 Tagen, irgendwelche Veränderungen des nicht stabilisierten Silberhydrosols beobachtet. Erst nach etwa 18 Tagen konnte man, bei den nicht verschlossenen Flaschen, sichere Zeichen von Präcipitation wahrnehmen.

[2]) Bei den früheren Untersuchungen am Menschen hatten wir äußerer Umstände halber auf die Bestimmung des fäkalen Stickstoffs verzichten müssen: die Schwankungen des Harnstickstoffs waren übrigens so konstant und so ausgesprochen, daß über die von den herangezogenen Kolloiden auf den Stoffwechsel ausgeübte Wirkung nicht der geringste Zweifel bestehen kann. Bei den gegenwärtigen Untersuchungen, welche uns die Möglichkeit darboten, auch eine Bestimmung des Kotstickstoffes vorzunehmen, haben wir dieselbe methodisch ausgeführt. Unsere diesbezüglichen Analysen haben uns interessante Anhaltspunkte geliefert, welche die früheren Beobachtungen vervollständigen.

[3]) Archivio di Farmacologia 7.

Wenn wir in erster Linie die Gesamtbilanz betrachten, so finden wir, daß die Einspritzung des stabilisierten Kolloids in der Versuchsperiode ein beträchtliches Stickstoff-Defizit bewirkt, welches bei der Hündin Nr. 1 etwa 3,7 g und bei der Hündin Nr. 2 2,1 g beträgt, ohne daß das Tier eine Temperatursteigerung oder irgend eine sonstige Störung aufwies.[1]) Dieser Verlust wird in der postexperimentellen Periode durch eine Stickstoff-Retention kompensiert, welche 4,6 g resp. 4,0 g beträgt. Es erfolgte also eine Überkompensation des N-Verlustes.

Das Mißverhältnis wird aber von den angeführten Zahlen nur ungenau wiedergegeben: es sind die Differenzen abzuziehen, welche von den mit solchen Versuchen stets verknüpften Fehlerquellen abhängen[2]) und deren täglicher Betrag nach der Vorbereitungsperiode annähernd geschätzt werden kann.

Andererseits muß auch ein anderer wichtiger Umstand in Betracht gezogen werden, welcher sowohl das Defizit wie die darauffolgende Überkompensation eher verwischt, nämlich die Tatsache, daß in den willkürlich abgegrenzten Versuchsperioden zuweilen Tage inbegriffen sind, welche in bezug auf die Stickstoffbilanz der nachfolgenden Restitutionsperiode zugerechnet werden müßten.

Bezüglich des Harnstickstoffs finden wir, daß, während die tägliche Stickstoffausscheidung zuerst um eine Durchschnittszahl von 4,5 g resp. 4,5 g herum schwankt, dieselbe in den der Einspritzung folgenden Tagen durchschnittlich 5,547 g resp. 5,664 g erreicht.

In den nachfolgenden Tagen tritt eine merkbare Neigung ein, durch eine Verminderung des Harnstickstoffs das Gleichgewicht wiederherzustellen; diese Verminderung allein kann aber den vorherigen Stickstoffverlust nicht vollständig ausgleichen. Beide Hündinnen haben während der postexperimentellen Periode durchschnittlich eine tägliche Menge von 4,2 g Stickstoff mit dem Harn ausgeschieden.

Diese Resultate entsprechen denjenigen unserer früheren Versuche am Menschen.

[1]) Die Temperatur wurde nur zweimal täglich gemessen, um das Tier nicht übermäßig zu stören.

[2]) Verlust durch Haarausfall, Hautabschuppung, Verlust kleiner Nahrungsmengen, Exkretionen usw.

Der fäkale N verhält sich anders als der Urin-N: die tägliche Menge des Kot-N beträgt bei der Hündin Nr. 1 während der Vorbereitungsperiode 0,519 g und sinkt sofort nach der Einspritzung auf 0,279 g; bei der Hündin Nr. 2 zeigt der Stuhlstickstoff ein ähnliches Verhalten.

Das nicht stabilisierte Kolloid erscheint wirkungslos auch wenn es in größeren Mengen eingespritzt wird.

Diese Resultate stimmen mit denjenigen der von uns über den Stoffwechsel am Menschen ausgeführten Untersuchungen überein und ebenso mit den Ergebnissen der Versuche, welche am Kaninchen[1]) ausgeführt wurden, um einen Vergleich zwischen der Wirkung des stabilisierten mit derjenigen des nicht stabilisierten Hydrosols auf die Körpertemperatur anzustellen. Vielleicht bilden sie das Gegenstück zu der von uns gemachten Beobachtung über die hemmende Wirkung, welche das Blut auf die durch das nicht stabilisierte Kolloid bewirkte Steigerung der Autolyse entfaltet.[2])

Auch das — bisher von diesem Gesichtspunkte nicht untersuchte — Collargol läßt den Stoffwechsel unbeeinflußt, sowohl wenn es in kleinen[3]) wie in großen Dosen eingespritzt wird; die Einspritzung dieser letzteren war sogar von einer geringen Verminderung des Harnstickstoffs begleitet.

Betrachten wir nun die Wirkung der einzelnen Salze auf den Stoffwechsel:

Das Silbernitrat hat die Fähigkeit gezeigt, den N-Stoffwechsel zu steigern: die dazu notwendige Menge übertrifft aber an Metallgehalt diejenige des stabilisierten Kolloids.

Die Hündin Nr. 1 scheidet, bei einer täglichen Einführung von 5,044 g Stickstoff, in der Vorperiode 4,515 g N durch den Harn und 0,419 g durch die Faeces aus; in den der Einspritzung von $AgNO_3$ folgenden Tagen steigt der Harn-N auf 5,037 g, während die Menge des durch die Faeces ausgeschiedenen N 0,508 g ist, also so gut wie unverändert bleibt, was also ein Gesamtdefizit von 0,137 g bedeutet, welches dann in

---

[1]) Diese Zeitschr. 14, 1908.

[2]) Ibidem.

[3]) Bei der Hündin Nr. 2 wurde die Einspritzung von kleinen Collargoldosen wiederholt, weil zu Ende des ersten Versuches Cystitis aufgetreten war. Die Resultate waren in beiden Fällen identisch.

der Nachperiode durch eine beträchtliche Stickstoffretention gedeckt wird.

Bei der Hündin Nr. 2 waren die Resultate annähernd den eben erwähnten gleich.

Das Silbernitrat bewirkt also nicht die Verminderung des fäkalen Stickstoffs, welche nach der Einführung des stabilisierten Hydrosols beobachtet wird.

Das Silberthiosulfat aktiviert den Stoffwechsel, wenn es in den Mengen eingespritzt wird, in welchen das Silbernitrat wirksam ist; es ist ebenso wie dieses inaktiv, wenn geringere Dosen eingeführt werden. Die Einspritzung des Thiosulfats ist, ähnlich wie es bei dem stabilisierten Hydrosol der Fall gewesen war, von einer Verminderung des fäkalen Stickstoffs begleitet, welche jedoch geringer und nicht so bedeutend ist, daß sie mit Sicherheit die Fehlergrenzen überschreitet.

Bezüglich des Silberalbuminates[1]) wurden — soweit sich der angestellte Vergleich erstreckt — keine Unterschiede von der Wirkung des Nitrates nachgewiesen.

II. Wirkung auf die Verteilung des Harnstickstoffs.

Wir haben uns darauf beschränkt, den Harnstoff und die Harnsäure zu bestimmen, wozu wir durch technische Gründe und durch die bei unseren früheren Untersuchungen am Menschen gesammelten Erfahrungen veranlaßt wurden. Auch beim Hunde wird, entsprechend dem damals beim Menschen erhobenen Befunde, die infolge der Einspritzung von stabilisiertem Silberhydrosol stattfindende Zunahme des Harnstickstoffs vollständig durch die Zunahme des Harnstoffs und der Harnsäure gedeckt.

Bei der einen Hündin (Nr. 2) nahm die Harnstoffmenge, ähnlich wie ich es beim Menschen beobachtet hatte, erst am

[1]) Das Silberalbuminat habe ich selbst hergestellt. Einer 5%igen Lösung von trockenem Eieralbumin (Erba) in destilliertem Wasser wurde ein gleiches Volumen 5%iger Silbernitratlösung zugesetzt, der Niederschlag auf einem Filter gesammelt, 4 Tage zuerst gegen fließendes und dann gegen destilliertes Wasser dialysiert, und wieder in destilliertem und leicht alkalisiertem Wasser aufgelöst. Der in Form von AgCl bestimmte Silbergehalt betrug 0,113 g pro 100 ccm Lösung.

zweiten Tage nach der Einspritzung zu, während bei der anderen (Nr. 1) bereits in den ersten 24 Stunden nach der Injektion eine ziemlich starke Zunahme nachgewiesen wurde, [5,588 g Harnstoffstickstoff (= 93%/₀ des Gesamtstickstoffs), statt der 3,604 g (= 79%/₀ des Gesamtstickstoffs), welche die tägliche Durchschnittszahl während der Vorbereitungsperiode dargestellt hatten].

Nachdem die Menge des Harnstoffs am zweiten Tage ein Maximum erreicht hat, sinkt sie in den folgenden Tagen, parallel mit den Zahlen des Gesamtstickstoffs, herab und erreicht gleichzeitig mit diesem normale oder Retentionszahlen.

Die Harnsäure zeigte ein den Schwankungen des Harnstoffs paralleles Verhalten. Während in der Vorperiode der Harn der Hündin Nr. 1 annähernd 0,035 g und derjenige der Hündin Nr. 2 ca. 0,045 g Harnsäure täglich enthielt, stieg nach der Einspritzung von stabilisiertem Ag die Menge der Harnsäure bei der Hündin Nr. 1 auf 0,090 — 0,114 — 0,118 — 0,108 — 0,085 — 0,100 g, und bei der Hündin Nr. 2 auf 0,064 — 0,101 — 0,132 — 0,160 — 0,199 — 0,117 g, wobei die Harnmenge unverändert blieb und die Tiere weder Temperatursteigerung noch sonst irgendwelche merkbare Störungen aufwiesen.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Erfahrungen überein, welche wir seinerzeit am Menschen gemacht hatten, wo die Menge der Harnsäure nach der Einspritzung von stabilisiertem Silberhydrosol sehr hohe Werte erreichte.

Es fragt sich nun, worauf diese Zunahme zurückzuführen ist. Die Zunahme der Harnsäureausscheidung durch den Harn bei Stickstoffgleichgewicht und konstanter Diät kann durch folgende Umstände hervorgerufen werden:

1. Bessere Resorption,
2. Steigerung der Spaltung der endogenen Nucleine,
3. gesteigerte Diurese,

wenn man von anderen Faktoren absieht, wie die Verminderung der Urikolyse und die Steigerung der Harnsäurebildung, deren Tragweite noch nicht genauer zu beurteilen ist.

In unserem Falle könnten, wenn man von einer Steigerung der Diurese absieht, welche bei keinem unserer Versuche nachgewiesen wurde, alle übrigen erwähnten Ursachen in Betracht kommen.

Sowohl bei den Beobachtungen am Menschen, wie bei den Versuchen an Hunden, ließe sich durch die Annahme einer gesteigerten Bildung oder einer verminderten Zerstörung von Harnsäure ein Teil ihrer Zunahme im Harne erklären.[1]) Dagegen liegt in den zwei Fällen ein verschiedener Sachverhalt vor, wenn die Möglichkeit einer vermehrten Ausscheidung von Harnsäure infolge besserer Resorption des eingeführten Stickstoffs in Erwägung gezogen wird. Während nämlich bei den Versuchen am Menschen durch die purinreiche Diät die Möglichkeit einer Zunahme der Harnsäure infolge besserer Verwertung der eingeführten Kost gegeben war, ist diese Annahme bei den Versuchen an Hunden, wo die Diät fast purinfrei war, mit Sicherheit gänzlich in Abrede zu stellen.

Diese Argumente werden auch durch die bei den Versuchen am Menschen gemachte Beobachtung — für welche sie ihrerseits eine Erklärung liefern können — unterstützt, daß nämlich der Zunahme der Urinharnsäure nicht eine parallele Zunahme der Phosphate folgt, welche zu erwarten wäre, wenn man die alleinige endogene Herkunft der Harnsäure annimmt.

Demnach können wir vermuten, daß vielleicht bei purinreicher Diät die nach der Einspritzung von stabilisiertem Hydrosol im Übermaß ausgeschiedene Harnsäure sowohl exogener wie endogener Herkunft ist, vielleicht mit Überwiegen der ersteren, daß dagegen bei purinarmer Diät die endogene Herkunft vorwiegt.

Die Einspritzungen von nicht stabilisiertem Hydrosol und von Collargol, in derselben Menge — in bezug auf Silbergehalt — in welcher das stabilisierte Kolloid angewendet wurde, bewirken keine Zunahme der ausgeschiedenen Harnstoff- und Harnsäuremenge: damit ist aber nicht ausgeschlossen, daß enorme Mengen[2]) des nicht stabilisierten Hydrosols eine solche Wirkung ausüben

[1]) Ich erinnere an unsere Versuche in vitro (diese Zeitschr. 1906). über die Wirkung des Silberhydrosols auf die Spaltung der Nucleine und auf die Urikolyse, aus welchen eine Steigerung der ersten und eine Hemmung der zweiten hervorging.

[2]) Die Beobachtungen von Foà u. Aggazzotti (Atti della R. Accad. di Medicina di Torino, 1907) über die toxische Wirkung hoher Dosen von nicht stabilisiertem Silberhydroxyl veranlaßten uns, von weiteren Versuchen mit stärkeren Dosen nicht stabilisierten Hydrols abzusehen.

können, wie für die fiebererzeugende Wirkung nachgewiesen wurde.[1])

Bezüglich des Kollargols sehen wir, daß hohe Dosen eine Steigerung der Ausscheidung von Harnsäure hervorrufen, ohne jedoch die Gesamtmenge des Stickstoffs zu beeinflussen.

Das Silbernitrat aktiviert, wenn es in gleichen Mengen in bezug auf den Silbergehalt des Kolloids eingeführt wird, fast ausschließlich den Nucleinstoffwechsel, während der Gesamtstickstoff fast unverändert bleibt. Wie aus den in Tabellen III und IV zusammengestellten Resultaten ersichtlich ist, folgt der Einspritzung von wenigen Milligrammen Silber in Form von Silbernitrat eine ziemlich starke Zunahme der täglich ausgeschiedenen Menge von Harnsäure.

Dagegen beeinflussen größere Mengen von Silbernitrat, ebenso wie diesen entsprechende Mengen von Silberalbuminat, nicht nur den Nucleinstoffwechsel, sondern auch die Gesamtstickstoffausscheidung. So steigen parallel mit der beträchtlichen Zunahme der Harnsäure nicht nur die Zahlen des Harnstoffs, sondern auch diejenigen des Gesamtstickstoffs.

Vom Silberthiosulfat erweisen sich die gewöhnlichen kleinen Dosen unwirksam, während starke Dosen eine beträchtliche Zunahme der Harnsäure und des Harnstoffs hervorrufen, und zwar eine so starke Zunahme, wie sie sogar nach Einspritzung des doch so aktiven stabilisierten Hydrosols (wenn auch in geringerer Menge) nie beobachtet wurde.

* * *

Die experimentellen Ergebnisse geben zu einigen Betrachtungen Anlaß.

Aus der Gesamtheit der Versuche geht hervor, daß, abgesehen vom Collargol und vom nicht stabilisierten Hydrosol, die verschiedenen untersuchten Silberpräparate auf den Stoffwechsel eine im großen und ganzen genommen wesentlich gleiche Wirkung entfalten: das stabilisierte Hydrosol, das

[1]) Diese Zeitschr. 1908.

Silbernitrat, das Thiosulfat und das Albuminat besitzen alle die Eigenschaft, den Stickstoffumsatz in ausgesprochener Weise anzuregen.

Diese Wirkung erstreckt sich nicht gleichmäßig auf den ganzen N-Umsatz; wenn sie auch nicht geradezu als eine elektive Wirkung angesprochen werden kann, betrifft sie doch vorwiegend den Nucleinstoffwechsel.

Sehr sonderbar ist das abweichende Verhalten des Kollargols und des nicht stabilisierten Hydrosols, welchen die aktivierende Wirkung abgeht; sehr hohe Dosen Collargol (dieselben können für das Hydrosol nicht in Frage kommen, weil sie eine übermäßige Flüssigkeitszufuhr erfordern würden) bewirken sogar eine geringe Verminderung der Stickstoffausscheidung durch den Harn. Dieses Verhalten legt die Vermutung nahe, daß auch der therapeutische Mechanismus des Collargols verschieden sein könne und gibt zu vergleichenden klinischen Untersuchungen in dieser Richtung Veranlassung.

Neben der Ähnlichkeit, welche die übrigen Präparate hinsichtlich ihrer Wirkung aufweisen, findet man jedoch, wenn man die Einzelheiten der Wirkung ins Auge faßt, merkbare Unterschiede, welche, wenn sie auch nicht sehr ausgesprochen sind, doch verdienen hervorgehoben und erwogen zu werden, besonders wenn man auf die große Kompliziertheit der Stoffwechselvorgänge Rücksicht nimmt und auf die Leichtigkeit, mit welcher toxische und therapeutische Wirkungen unterdrückt oder maskiert werden können. Diesen Verschiedenheiten wollen wir etwas näher treten.

In erster Linie ist die Aktivität der verschiedenen Präparate eine verschiedene. Die Dosen, welche erforderlich sind, um ungefähr gleich deutliche Effekte zu bewirken, sind bezüglich ihres Metallgehaltes durchaus nicht gleich für die verschiedenen Präparate, sondern enstprechen sehr verschiedenen Silbermengen. Unter diesem Gesichtspunkte kann man sie folgendermaßen in absteigender Reihenfolge anordnen:

Stabilisiertes Hydrosol,
Silbernitrat,
Silberthiosulfat,
Silberalbuminat.

Verschieden ist auch der Einfluß, welchen die einzelnen Präparate auf die Menge des durch die Faeces abgesonderten Stickstoffs ausüben. Die Einspritzung von stabilisiertem Silberhydrosol ist von einer deutlichen Abnahme des fäkalen Stickstoffs begleitet.[1]) Das Silberalbuminat und Thiosulfat scheinen eine ähnliche Wirkung zu besitzen, obwohl die Verminderung des fäkalen Stickstoffs weniger ausgesprochen ist und nicht zu ganz sicheren Schlußfolgerungen berechtigt. Das Silbernitrat endlich übt auf die Ausscheidung des Stickstoffs durch die Faeces keinen greifbaren Einfluß aus. Der Mechanismus dieser Verminderung der fäkalen Stickstoffschlacken durch die erwähnten Präparate ist nicht ohne weiteres zu beurteilen; es könnte sich dabei um eine bessere Resorption oder um eine komplexere Wirkung auf den Verdauungstractus oder endlich um andere Ursachen handeln.

Endlich unterscheiden sich die einzelnen Präparate voneinander durch den verschiedenen Einfluß, welchen sie auf die Fraktionen des Harnstickstoffs ausüben. Es beeinflussen zwar alle untersuchten Präparate besonders den Nucleinstoffwechsel und bewirken eine bedeutende Steigerung der Ausscheidung der Harnsäure durch den Harn, aber diese Wirkung ist nicht bei allen Präparaten einfach der Gesamtwirkung proportional; das Verhältnis $\frac{\text{Harnsäure}}{\text{Gesamtstickstoff}} \times 100$ ergibt verschiedene und für die einzelnen Präparate charakteristische Werte.

In dieser Hinsicht äußert das stabilisierte Kolloid die intensivste Wirkung; nach ihm kommen in absteigender Reihenfolge das Thiosulfat, das Nitrat, das Albuminat und zuletzt das Collargol. Ähnliche Unterschiede beobachtet man auch bezüglich des Harnstoffes; aber in dieser Hinsicht stellt sich die Wirksamkeit der einzelnen Präparate in einer verschiedenen Reihenfolge: Kolloid, Nitrat, Albuminat, Thiosulfat. Das Collargol ist in dieser Beziehung so gut wie wirkungslos.

Schließlich ist, besonders im Falle des Hydrosols, die Neigung des Organismus beachtenswert, die in der ersten Periode

[1]) In unserem Falle waren die Verhältnisse besonders günstig, um diese Erscheinung klar zum Vorschein zu bringen, weil die ausschließlich aus pflanzlichen und deshalb an stickstoffhaltigen Schlacken sehr reichen Eiweißkörpern bestehende Kost sich zu einer besseren Ausnutzung eignete.

erlittenen Verluste überzukompensieren. In dieser Hinsicht ist die Wirkung der einzelnen Präparate etwas verschieden, anderseits aber weder sehr ausgesprochen noch konstant.

* * *

Die neueren Ansichten — von Krönig und Paul[1]), welche nachgewiesen haben, daß die antiseptische Wirkung der Silbersalze und der Quecksilbersalze auf die entsprechenden Ionen zurückzuführen ist, bis zu Sabbatani[2]), welcher interessante Untersuchungen über die verschiedene Giftigkeit der Salze der Schwermetalle mit Bezug auf die Art der dissoziierten Ionen ausgeführt hat — neigen dazu, die physiologische und toxische Wirkung der Salze als Ionenwirkung aufzufassen. Gehen wir von diesem Gesichtspunkte aus, so bietet die Deutung der mit Silbernitrat und Thiosulfat erhaltenen Resultate keine Schwierigkeit. Dieselben entsprechen — abgesehen von der Verschiedenheit der angewendeten Dosen — denjenigen von Sabbatani; ebenso wie bei diesen können die Wirkungsunterschiede zwischen dem Nitrat und dem Thiosulfat auf die verschiedenen Ionen (das einfache Silberion und das komplexe Ion) zurückgeführt werden, welche sich in den Lösungen der zwei Salze dissoziieren.

Bezüglich des Albuminates wissen wir aus den bekannten Untersuchungen von Galeotti[3]), daß sich neben den organischen Verbindungen des Silbers immer in einem wechselnden Gleichgewichtszustand das Metallion befindet. Die Reversibilität dieses Gleichgewichts rechtfertigt die aprioristische Annahme, daß die Wirkung der Einspritzungen von Albuminat sich derjenigen des Nitrates[4]) nähern dürfte, und die Versuche, aus welchen sich bei den verhältnismäßig hohen angewendeten Dosen keine be-

---

[1]) Zeitschr. f. Hygiene und Infekt. 25.

[2]) Arch. di psichiatria, antropologia criminale e medicina legale, 25, 1904.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 40.

[4]) Es sei hier an die Untersuchungen von E. Cohen, Zeitschr. f. phys. Chem. 18, 1895 und von W. Richards und H. Jaber, Zeitschr. f. phys. Chem. 32, 1900 erinnert, welche ergeben haben, daß in Gegenwart eines Überschusses von Natriumthiosulfat viele der charakteristischen Reaktionen des Ag nicht zutage treten, und auch mit Eiweiß kein Niederschlag entsteht.

achtenswerten Unterschiede zwischen den Einspritzungen von Albuminat und denjenigen von Nitrat ergaben, scheinen diese theoretischen Folgerungen zu bestätigen und für die Zulässigkeit der erwähnten Deutung zu sprechen.

Die interessanteste Erscheinung, welche mich auch zu den vorliegenden Untersuchungen veranlaßte, bildet die eigentümliche, durch unsere Versuche an Menschen festgestellte Wirkung des Hydrosols auf den Stoffwechsel, welche durch die gegenwärtigen Versuche bestätigt wird. Wir wollen versuchen, ob dieselbe von demselben Gesichtspunkte aus der Deutung zugänglich ist. Bereits Bredig[1]) gibt an, Billitzer[2]), Blake[2]) und Rebière[3]) haben es bestätigt, daß das zuerst von ihm auf elektrischem Wege hergestellte Silberhydrosol neben Teilchen von metallischem Silber auch solche von Silberoxyd (Ag_2O) enthält. Diese letzteren sind, wenn auch in geringem Maße, wasserlöslich und der gelöste Teil kann vermittels der dissoziierten Silberionen in derselben Weise wirken, wie eine verdünnte Silbersalzlösung.

Hierdurch entsteht die Annahme, daß, alles in allem, die Wirkung des Hydrosols auch eine Ionenwirkung ist, und daß die Unterschiede nur von der großen Langsamkeit herrühren, mit welcher die Silberionen, die einerseits aus der Dissoziation der sich allmählich lösenden Ag_2O-Partikelchen abstammen, und anderseits sich von den ultramikroskopischen Silberteilchen ablösen[4]), in Freiheit gesetzt werden.

Die experimentellen Ergebnisse widersprechen dieser Auffassung nicht: die Wirkung des Hydrosols ist, wie wir gesehen haben, nicht wesentlich von derjenigen der Salze verschieden; die bereits besprochenen Einzelheiten, in welchen sie etwas abweicht, scheinen im Gegenteil durch den angeführten Mechanismus in befriedigender Weise erklärt werden zu können.

Von diesem Standpunkte aus läßt sich auch die Inaktivität des nicht stabilisierten Hydrosols ohne Schwierigkeit erklären: die ausgebliebene Stabilisierung befördert die Fällung des Kol-

---

[1]) Anorganische Fermente, S. 33. — Kohlschütter, Zeitschr. f. Elektrochem. 14, 62 bis 63, 1904.

[2]) Zitiert nach Rebière.

[3]) Compt. rend. d. l'Acad. des Sciences 1909.

[4]) Cfr. L. Michaelis, Physik. Chem. der Kolloide, in Koranyi-Richter, Physikal. Chem. und Medizin, 2, 378.

loids und dadurch wird der langsame Ionisierungsprozeß verhindert, oder beträchtlich gehemmt.

Schließlich verdient die Verschiedenheit der Resultate betont zu werden, welche mit dem Thiosulfat und dem stabilisierten Hydrosol erhalten werden: auch hier finden die Besonderheiten, durch welche sich diese zwei Körper in ihrer Wirkung auf den Stoffwechsel voneinander unterscheiden, eine einfache Erklärung, wenn man bedenkt, daß wir es im ersten Falle mit einer leicht dissoziierbaren Verbindung zu tun haben, aus welcher aber komplexe Silberionen hervorgehen, während es sich im zweiten Fall um ein Präparat handelt, aus welchem die Bildung von Ionen äußerst langsam von statten geht, aus dem aber direkt Silberionen hervorgehen.

Die dargelegten Gesichtspunkte führen somit zu einer einheitlichen Auffassung der biologischen Wirkung der Silberverbindungen, indem sie ihre verschiedene Wirkung einfach von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften ableiten. Es schien uns deshalb angebracht, etwas näher darauf einzugehen; obwohl nicht vergessen werden darf, daß, wenn der Ausgangspunkt der Ausführungen von nachgewiesenen Tatsachen gebildet ist, wir allmählich ein ganz hypothetisches Feld betreten haben und daß alle in diesem letzten Teile aufgeführten Betrachtungen rein hypothetischer Natur sind.

Die tatsächlichen Ergebnisse unserer Beobachtungen können wir folgendermaßen zusammenfassen:

1. Das Silber beschleunigt, sowohl wenn es als stabilisiertes Hydrosol, wie in Salzform oder als Albuminat direkt in den Kreislauf eingeführt wird, bedeutend den Stickstoff- und besonders den Nucleinstoffwechsel.

2. Als stabilisiertes Hydrosol eingeführt, bewirkt das Silber eine Verminderung der N-Ausscheidung durch die Faeces.

3. Um dieselbe Wirkung durch Silbernitrat, -albuminat oder -thiosulfat zu erzielen, sind von diesen Substanzen viel höhere Dosen notwendig, als von stabilisiertem Hydrosol.

4. Dieser Einfluß auf den Stoffwechsel wird durch Einspritzung von mäßigen Dosen nicht stabilisierten Kolloids und sowohl von minimalen, wie von hohen Collargoldosen nicht ausgeübt.

Tabelle II.

Hündin Nr. 1. Diät: Brot 375 g; destill. Wasser 800 ccm; Kochsalz 2 g.

Datum	Behandlung und Bemerkungen	N-Einfuhr g	Faeces Menge (getrocknet) g	Faeces N g	Faeces N pro die g	Harn Menge ccm	Harn Gesamt N g	Gesamt-N-Ausfuhr g	N-Bilanz	Harnstoff-N g	Harnstoff g	Harnsäure-N mg	Harnsäure mg	Quotient (N U : N) × 100	Quotient (N Ū : N) × 100
Okt.															
16.-17.		5,044				655	4,568	4,987	+ 0,057	3,672	7,897	13,3	39,9	80,38	0,29
17.-18.		„				655	4,356	4,769	+ 0,275	3,420	7,329	10,3	30,8	78,62	0,24
18.-19.		„	73,074	2,094	0,419	635	4,618	5,037	+ 0,007	3,833	8,214	11,0	32,9	83,00	0,24
19.-20.		„				620	4,466	4,885	+ 0,159	3,465	7,525	11,5	34,6	77,58	0,26
20.-21.		„				920	4,573	4,992	+ 0,052	3,630	7,779	12,7	38,1	79,38	0,28
Mittelwert		5,044			0,419		4,515	4,934	+ 0,110	3,604	7,749	11,7	35,1	79,82	0,26
21.-22.	21. X. 9 Uhr morgens 20 ccm Ag-Hydrosol nicht stabil. intrav. = 4,28 mg Ag	5,044				510	3,960	4,650	+ 0,394	3,466	7,428	8,6	24,8	87,52	0,22
22.-23.		„	84,651	2,760	0,690	530	4,093	4,783	+ 0,261	3,616	7,749	12,7	38,1	88,34	0,31
23.-24.		„				515	4,013	4,703	+ 0,341	3,181	6,817	11,7	38,7	79,26	0,29
24.-25.		„				530	4,687	5,377	– 0,333	3,721	7,947	12,9	30,6	79,38	0,27
Mittelwert		5,044			0,690		4,188	4,878	+ 0,166	3,496	7,485	11,5	34,5	83,47	0,27
25.-26.		5,044				920	4,700	5,151	– 0,107	3,809	8,163	10,2	30,6	81,04	0,22
26.-27.		„				600	4,698	5,149	– 0,105	3,948	8,461	11,5	34,5	84,04	0,24
27.-28.		„				610	4,643	5,094	– 0,050	3,716	7,963	11,7	35,1	80,03	0,25
28.-29.		„				580	4,598	5,049	– 0,005	3,478	7,433	12,4	37,2	75,64	0,27
29.-30.		„				615	4,446	4,897	+ 0,147	3,609	7,734	10,9	32,9	81,18	0,30
30.-31.		„	103,569	4,510	0,451	630	4,497	4,948	+ 0,096	3,641	7,803	10,4	31,2	81,00	0,23
31. Okt.-1. Nov.		„				900	4,461	4,912	+ 0,132	3,757	8,052	10,0	29,9	84,20	0,23
1.-2.		„				610	4,402	4,853	+ 0,191	3,258	6,982	11,1	33,2	74,01	0,25
2.-3.		„				580	4,449	4,900	+ 0,144	3,692	7,821	11,5	34,5	82,99	0,26
3.-4.		„				600	4,429	4,880	+ 0,164	3,258	6,982	11,2	33,7	73,56	0,25
Mittelwert		5,044			0,451		4,532	4,983	+ 0,061	3,617	7,739	11,1	33,3	79,81	0,24
4.-5.	4. XI. 9 Uhr morgens 10 ccm Ag-Hydrosol stabil. Nr. 3 intrav. = 3,2 mg Ag	5,044				570	5,990	6,169	– 1,125	5,588	11,975	30,0	90,1	93,29	0,50
5.-6.		„	38,330	0,716	0,179	610	6,143	6,322	– 1,278	5,832	12,502	38,2	114,5	94,91	0,62
6.-7.		„				720	5,855	5,034	+ 0,010	4,377	9,380	39,5	118,6	90,15	0,81
7.-8.		„				800	5,198	5,377	– 0,333	4,396	9,421	36,0	108,0	84,70	0,69
Mittelwert		5,044			0,179		5,547	5,726	– 0,682	5,048	10,819	35,9	107,7	91,00	0,65
8.-9.		5,044				915	4,053	4,160	+ 0,884	3,139	6,727	28,5	85,5	77,45	0,70
9.-10.		„				830	4,065	4,172	+ 0,872	3,370	7,222	33,4	100,4	82,71	0,83
10.-11.		„	37,033	0,640	0,107	620	4,263	4,270	+ 0,774	3,162	6,776	10,9	32,8	76,50	0,26
11.-12.		„				710	4,151	4,258	+ 0,786	3,331	7,138	17,6	52,7	80,25	0,42
12.-13.		„				860	4,293	4,300	+ 0,744	3,313	7,100	15,0	45,1	75,42	0,35
13.-14.		„				580	4,319	4,426	+ 0,618	3,089	6,620	12,6	37,9	71,52	0,29
Mittelwert		5,044			0,107		4,174	4,281	+ 0,763	3,234	6,931	19,7	59,1	77,48	0,47

Tabelle II. (Fortsetzung.)

Datum	Behandlung und Bemerkungen	N-Einfuhr g	Faeces: Menge (getrocknet) g	Faeces: N g	Faeces: N pro die g	Harn: Menge ccm	Harn: Gesamt-N g	Gesamt-N-Ausfuhr g	N-Bilanz	Harnstoff-N g	Harnstoff g	Harnsäure-N mg	Harnsäure mg	Quotient (N Ü : N) × 100	Quotient (N Ū : N) × 100
14.-15.	14. XI. 9 Uhr morgens 10 ccm Collargolum (Heyden) 1:500 intrav. = 16 mg Ag	5,044	72,617	2,124	0,531	710	4,289	4,820	+ 0,224	3,313	7,100	16,9	50,9	77,24	0,39
15.-16.		„				910	4,001	4,532	+ 0,512	3,510	7,522	12,3	37,0	87,72	0,31
16.-17.		„				800	4,212	4,743	+ 0,301	4,056	8,692	21,7	65,0	96,29	0,52
17.-18.		„				680	3,715	4,246	+ 0,798	3,347	7,934	15,0	45,0	90,10	0,40
Mittelwert		5,044			0,531		4,054	4,585	+ 0,459	3,556	7,812	16,5	49,5	87,71	0,41
18.-19.		5,044	85,400	3,116	0,779	590	4,493	5,272	– 0,228	3,398	7,282	11,7	35,0	75,63	0,26
19.-20.		„				760	4,269	5,048	– 0,004	3,229	6,920	14,3	43,0	75,64	0,32
20.-21.		„				750	4,307	5,086	– 0,042	3,145	6,740	12,0	36,0	73,02	0,28
21.-22.		„				800	4,440	5,219	– 0,175	3,482	7,462	10,0	30,0	78,42	0,23
Mittelwert		5,044			0,779		4,377	5,156	– 0,112	3,313	7,101	12,0	36,0	75,69	0,27
22.-23.	22. XI. 9 Uhr morgens 10 ccm $AgNO_3$ n/100 intrav. = 10,8 mg Ag	5,044	57,00	2,032	0,508	680	4,907	5,415	– 0,371	4,099	8,784	13,0	39,0	85,48	0,27
23.-24.		„				690	5,195	5,703	– 0,659	4,605	9,869	23,3	70,0	88,64	0,45
24.-25.		„				750	5,636	6,144	– 0,100	4,797	10,279	23,3	70,0	85,20	0,39
25.-26.		„				710	4,408	4,916	+ 0,128	3,822	8,191	17,7	53,0	86,70	0,40
Mittelwert		5,044			0,508		5,037	5,545	– 0,501	4,331	9,281	19,3	57,9	86,02	0,38
26.-27.		5,044	40,224	1,408	0,327	830	3,479	3,806	+ 1,238	2,370	5,079	12,6	36,9	68,12	0,36
27.-28.		„				650	4,520	4,847	+ 0,197	4,008	8,589	15,0	45,0	88,65	0,33
28.-29.		„				695	4,521	4,848	+ 0,196	3,180	6,815	12,5	37,6	75,33	0,29
29.-30.		„				735	4,493	4,820	+ 0,224	3,589	7,691	10,3	31,0	79,88	0,23
Mittelwert		5,044			0,327		4,252	4,579	+ 0,465	3,287	7,043	12,6	37,8	77,30	0,29
30. Nov. b. 1. Dez.	30. XI. 9 Uhr morgens 10 ccm Silberalbuminat intravenös = 11,3 mg Ag	5,044	70,700	2,305	0,461	780	4,915	5,376	– 0,332	4,107	8,801	23,3	70,0	83,36	0,47
1.-2.		„				745	5,195	5,656	– 0,612	4,680	10,029	28,7	86,0	90,08	0,55
2.-3.		„				664	5,265	5,726	– 0,682	4,819	10,327	23,7	71,0	91,52	0,45
3.-4.		„				690	5,335	5,796	– 0,752	4,612	9,884	26,3	79,0	86,44	0,49
4.-5.		„				670	4,998	5,459	– 0,415	4,009	8,591	23,3	70,0	80,21	0,47
Mittelwert		5,044			0,461		5,141	5,602	– 0,558	4,445	9,526	25,1	75,3	86,47	0,49
5.-6.		5,044	30,242	1,250	0,208	610	4,115	4,323	+ 0,721	3,092	6,626	12,7	38,0	75,14	0,31
6.-7.		„				750	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7.-8.		„				840	4,025	4,233	+ 0,811	3,017	6,465	8,7	26,2	74,96	0,22
8.-9.		„				715	4,226	4,434	+ 0,610	3,410	7,308	12,5	37,6	80,69	0,30
9.-10.		„				725	4,100	4,308	+ 0,736	3,092	6,626	12,7	38,0	75,41	0,31
10.-11.		„				760	4,071	4,279	+ 0,765	3,092	6,626	10,8	32,4	75,95	0,27
Mittelwert		5,044			0,208		4,107	4,315	+ 0,729	3,141	6,730	11,5	34,5	76,48	0,28

Tabelle II (Fortsetzung).

Datum	Behandlung und Bemerkungen	N-Einfuhr g	Faeces: Menge (getrocknet) g	Faeces: N g	Faeces: N pro die g	Harn: Menge ccm	Harn: Gesamt-N g	Gesamt-N-Ausfuhr g	N-Bilanz	Harnstoff-N g	Harnstoff g	Harnsäure-N mg	Harnsäure mg	Quotient $(N\overset{+}{U}:N)\times 100$	Quotient $(N\bar{U}:N)\times 100$
Dez.															
11.-12.	11. XII. 9 Uhr morg. 10 ccm Collargolum Heyden 1:2500 intravenös = 3,2 mg Ag	5,044				810	4,355	4,995	+ 0,049	3,482	7,462	12.2	36,5	79,95	0,28
12.-13.		„				915	4.186	4,826	+ 0,218	3,790	8,122	12,6	37,9	90,54	0,30
13.-14.		„				615	4,147	4,787	+ 0.257	3.790	8,122	10,2	30,7	81,39	0,25
14.-15.		„	87,242	4,485	0,640	725	4 284	4,924	+ 0,120	3,790	8,122	11,9	35,6	88,51	0,28
15.-16.		„				835	4,359	4,999	+ 0,045	3,560	7.629	12,8	38,4	81,67	0,29
16.-17.		„				850	4,272	4,912	+ 0,132	3,840	8,229	12,9	38,6	89,89	0,30
17.-18.		„				800	4,372	5,012	+ 0,032	3,680	7,886	12,7	38,0	84,17	0,29
Mittelwert		5,044			0,640		4,382	4,922	+ 0,122	3,704	7,939	12,2	36,6	84,53	0,28
18.-19.		5,044				690	4,188	4,996	+ 0,048	3,441	7,374	10,6	32,0	82,16	0,25
19.-20.		„	68,4	2,424	0,808	680	4,226	5,034	+ 0,010	3,417	7,323	10,5	31,4	80,86	0,25
20.-21.		„				850	3,960	4,768	+ 0,276	3,430	7,350	12,4	37,3	86,61	0,42
Mittelwert		5,044			0,808		4,124	4,932	+ 0,112	3,429	7,349	11,2	33,6	83,15	0,27
21.-22.	21. XII. 9 Uhr morg. 15 ccm $AgNO_3$ n/500 intrav. = 3,24 mg Ag	5,044				820	4,670	5,513	− 0,469	3,880	8,315	13,2	39,5	83,08	0,28
22.-23.		„				830	4,340	5,183	− 0,139	3,630	7,779	21,4	64,2	83,64	0,49
23.-24.		„	143,827	5,055	0,843	750	4,820	4,663	+ 0,381	3,040	6,515	22,5	67,5	89,66	0,59
24.-25.		„				790	4,628	5,471	− 0,427	3,820	8,186	20,4	61,2	82,54	0,44
25.-26.		„				730	4,230	5,073	− 0,029	3,210	6,869	16,8	50,4	75,88	0,40
26.-27.		„				720	4,180	5,023	+ 0,021	3,180	6,815	12,5	37,6	76,07	0,30
Mittelwert		5,044			0,843		4,311	5,154	− 0,110	3,460	7,415	17,8	53,4	80,26	0,41
27.-28.		5,044				700	4,260	4,638	+ 0,406	3,480	7,458	10,7	32,2	81,69	0,25
28.-29.		„	39,5	1,512	0,378	710	4,188	4,566	+ 0,478	3,162	6,776	10,8	32,5	75,50	0,26
29.-30.		„				730	4,210	4,588	+ 0,456	3,331	7,138	8,8	26,5	79,12	0,21
30.-31.		„				690	4,290	4,666	+ 0,378	3,370	7,222	9,1	27,3	78,55	0,21
Mittelwert		5,044			0,378		4,237	4,615	+ 0,429	3,336	7,148	9,8	29,4	78,73	0,28
31. Dez. b. 1. Jan.	31. XII. 9 Uhr morgens 15 ccm Silberthiosulfat n/500 = 3,24 mg Ag	5,044				630	4,719	5,102	− 0,058	3,790	8,122	8,7	26,2	82,18	0,18
1.-2.		„				730	4.857	5,240	− 0,196	3,870	8,293	10,7	32,2	79,68	0,22
2.-3.		„				710	4,540	4,923	+ 0,121	3,690	7,908	8,1	24,5	82,41	0,18
3.-4.		„				680	4,635	5,018	+ 0,026	3,880	8,315	9,5	28,6	83,71	0,20
4.-5.		„	69,402	3,064	0,383	690	4,584	4,967	+ 0,077	3,410	7,308	10,5	31,4	74,39	0,23
5.-6.		„				800	4,517	4,900	+ 0,144	3,441	7,374	10,8	32,5	76,18	0,24
6.-7.		„				730	4,437	4.820	+ 0,224	3,554	7,316	12,3	36,9	80,10	0,28
7.-8.		„				750	4,430	4,813	+ 0,231	3,340	7,158	12,6	37,8	75,39	0,28
Mittelwert		5,044			0,383		4,589	4,972	+ 0,072	3,609	7,762	10,4	31,2	80,41	0,28
8.-9.		5,044				650	4,212	4,640	+ 0,404	3,530	7,565	12,7	38.2	71,33	0,30
9.-10.		„	38,412	1,284	0,428	890	4,790	5,218	− 0,174	3,500	7,500	11,8	35,4	73,07	0,25
10.-11.		„				615	4,493	4,921	+ 0,123	3,594	7,702	13,2	39,5	79,99	0,29
Mittelwert		5,044			0,428		4,948	4,926	+ 0,118	3,541	7,589	12,6	37,8	78,73	0,28

Tabelle II (Fortsetzung).

Datum	Behandlung und Bemerkungen	N-Einfuhr	Faeces			Harn		Gesamt-N-Ausfuhr	N-Bilanz	Harnstoff-N	Harnstoff	Harnsäure-N	Harnsäure	Quotient ($N\overset{+}{U}$: N) × 100	Quotient ($N\bar{U}$: N) × 100
			Menge (getrocknet)	N	N pro die	Menge	Gesamt-N								
		g	g	g	g	ccm	g	g		g	g	mg	mg		
Jan.															
11.-12.	11. I. 9 Uhr morg. 10 ccm Silberthiosulfat n/100 intrav. = 10,8 mg Ag	5,044	49,120	1,974	0,329	610	4,674	5,003	+ 0,041	4,077	8,737	25,2	75,6	87,23	0,54
12.-13.		"				710	5,130	5,459	– 0,415	4,088	8,743	38,4	115,2	79,33	0,75
13.-14.		"				540	5,464	5.793	– 0,749	4,377	9,380	37,2	111,6	80,11	0,68
14.-15.		"				630	5,229	5,558	– 0,514	4,396	9,421	39,3	117,9	84,07	0,75
15.-16.		"				840	4.738	5,067	– 0,023	4,077	8,737	30,1	90 3	86,05	0,64
16.-17.		"				730	4,585	4.914	+ 0,130	3.840	8,229	20,5	61,5	83,75	0,45
Mittelwert		5,044			0,329		4,970	5,299	– 0,255	4,141	8,874	31,8	95,4	83,32	0,64
17.-18.		5,044	31,120	0,945	0,315	850	4,749	5.064	– 0,020	3,880	8,315	18,7	56,1	81,70	0,39
18.-19.		"				740	3,479	3,794	+ 1,250	2,615	5.604	12,9	38,7	80,54	0,37
19.-20.		"				890	4,342	4,657	+ 0.387	3,630	7,779	10,8	32,4	83.60	0,24
Mittelwert		5,044			0,315		4,190	4,505	+ 0,539	3,375	7,232	14,1	42,3	80,55	0,34

Tabelle III.

Hündin Nr. 2. Diät: Brot 400 g; destill. Wasser 800 ccm; Kochsalz 2 g.

Datum	Behandlung und Bemerkungen	N-Einfuhr	Faeces			Harn		Gesamt-N-Ausfuhr	N-Bilanz	Harnstoff-N	Harnstoff	Harnsäure-N	Harnsäure	Quotient ($N\overset{+}{U}$: N) × 100	Quotient ($N\bar{U}$: N) × 100
			Menge (getrocknet)	N	N pro die	Menge	Gesamt-N								
		g	g	g	g	ccm	g	g		g	g	mg	mg		
Dez.															
17.-18.		5,380	96,0	3,880	0,647	800	4,619	5,266	+ 0,114	3,790	8,122	16,3	48,9	80,31	0,35
18.-19.		"				830	4,521	5,168	+ 0,212	3,690	7,908	13.7	41,1	81,61	0,30
19.-20.		"				850	4,521	5,168	+ 0,212	3,441	7,374	14,3	43,0	76,07	0,32
20.-21.		"				790	4,201	4,848	+ 0,532	3,426	7,342	15,9	47,7	81,36	0,38
21.-22.		"				870	4,563	5,210	+ 0,170	3.554	7,616	14,0	42,0	77,88	0,31
22.-23.		"				850	4,340	4.987	+ 0,393	3,340	7,158	16,2	48.6	76,95	0,37
Mittelwert		5,380			0,647		4,461	5,108	+ 0,272	3,540	7,587	15,1	45,3	79,33	0,34
23.-24.	23. XII. 9 Uhr morg. 25 ccm Ag-Hydrosol nicht stabil. Nr. 24 intrav. = 9,5 mg Ag	5,380	96,560	2,700	0,675	810	4,417	5,092	+ 0,288	3,554	7,616	13,6	40,8	80,46	0,31
24.-25.		"				845	4,170	4,845	+ 0,535	3,331	7,138	14,3	43,1	79,88	0,34
25.-26.		"				870	4,670	5,345	+ 0,035	3,630	7,779	13,2	40,7	77,71	0,28
25.-27.		"				900	5.153	5,828	– 0,448	3,880	8,315	14,9	44.8	75,29	0,29
Mittelwert		5,380			0,675		4,603	5,278	+ 0,102	3,598	7,712	14,0	42,0	78,16	0,30
27.-28.		5,380	74,312	2,277	0,759	815	4,556	5,315	+ 0,065	3,790	8,122	15,9	47,6	83,18	0,35
28.-29.		"				850	4,647	5,406	+ 0,026	3,870	8,293	14,3	43,0	83,27	0,31
29.-30.		"				770	4,386	5,145	+ 0,235	3,630	7,779	15,1	45,3	82,76	0,34
Mittelwert		5,380			0,759		4,529	5,289	+ 0,091	3,763	8,065	15,1	45,3	83,08	0,33

Tabelle III (Fortsetzung).

Datum	Behandlung und Bemerkungen	N-Einfuhr	Faeces			Harn		Gesamt-N-Ausfuhr	N-Bilanz	Harnstoff-N	Harnstoff	Harnsäure-N	Harnsäure	Quotient (N Ū : N) × 100	Quotient (N Ū : N) × 100
			Menge (getrocknet)	N	N pro die	Menge	Gesamt-N								
		g	g	g	g	ccm	g	g		g	g	mg	mg		
Dez. 30.-31.	30. XII. 9 Uhr morg. 10 ccm Ag-Hydrosol stabil. Nr. 34 intravenös = 3,2 mg Ag	5,380	37,190	1,020	0,255	830	5,668	5,923	− 0,543	4,324	9,267	21,6	64,7	76,29	0,38
31. Dez. b. 1. Jan.		"				870	6,023	6,278	− 0,898	5,683	12,179	33,9	101,8	94,35	0,56
1.-2.		"				890	6,331	6,586	− 1,206	5,832	12,498	44,0	132,0	92,12	0,70
2.-3.		"				730	4,633	4,888	+ 0,492	3,839	8,227	53,3	160,0	82,84	1,15
Mittelwert		5,380			0,255		5,664	5,919	− 0,539	4,919	10,543	50,9	152,7	86,85	0,90
3.-4.		5,380	22,700	0,620	0,155	800	4,247	4,402	+ 0,978	3,647	7,816	66,3	199,0	85,87	1,56
4.-5.		"				820	4,071	4,226	+ 1,154	3,274	7,016	39,0	117,0	80,41	0,96
5.-6.		"				770	4,305	4,458	+ 0,922	3,336	7,149	19,9	59,7	77,50	0,46
6.-7.		"				840	4,230	4,385	+ 0,995	3,305	7,083	16,7	50,2	78,13	0,39
Mittelwert		5,380			0,155		4,213	4,368	+ 1,012	3,390	7,516	47,3	141,9	80,46	1,12
7.-8.	7. I. 9 Uhr morgens 10 ccm Collargolum Heyden 1:2500 intravenös = 3,2 mg Ag	5,380	100,727	3,348	0,837	810	4,521	5,358	+ 0,022	3,425	7,339	18,7	56,2	75,75	0,41
8.-9.		"				820	4,472	5,309	+ 0,071	3,398	7,282	14,7	44,3	75,98	0,33
9.-10.		"				820	4,086	4,923	+ 0,457	3,080	6,600	16,2	48,7	75,38	0,40
10.-11.		"				815	4,320	5,157	+ 0,243	3.378	7,329	13,4	40,1	78,19	0,40
Mittelwert		5,380			0,837		4,350	5,187	+ 0,193	3,320	7,040	15,6	46,8	76,32	0,36
11.-12.		5,380	25,700	1,448	0,724	845	4,815	5,539	− 0,159	3,841	7,159	16.6	49,7	79,77	0,34
12.-13.		"				895	4,282	5,006	+ 0,374	3,094	6,630	18,4	55,3	72,25	0,43
Mittelwert		5,380			0,724		4,549	5,273	+ 0,107	3,468	6,894	17,5	52,5	76,24	0,38
18.-19.	Infolge von Cystitis fällt die Bestimmung der N-Ausfuhr vom 13. I. bis 18. I. aus	5,380	51,740	1,961	0,490	880	4,212	4,702	+ 0,578	3,111	6,667	14,3	42,5	73,86	0,34
19.-20.		"				890	4,622	5,112	+ 0,268	3,703	7,936	13,6	40,8	80,11	0,29
20.-21.		"				810	4,650	5,140	+ 0,240	3,836	8,221	13,7	41,2	82,49	0,29
21.-22.		"				870	4,552	5,012	+ 0,268	3,878	8,311	16,9	50,7	85,19	0,37
Mittelwert		5,380			0,490		4,509	4,999	+ 0,381	3,632	7,784	14,8	44,4	80,55	0,33
22.-23.	22. I. 9 Uhr morgens 10 ccm Collargolum Heyden 1:2500 intravenös = 3,2 mg Ag	5,380	46,096	2,096	0,524	840	4,580	5,104	+ 0,276	3,527	7,558	23,6	70,9	77,11	0,52
23.-24.		"				830	4,485	5,009	+ 0,371	3,318	7,110	17,6	52,7	73,98	0,39
24.-25.		"				890	4,815	5,339	+ 0,041	3,672	7,897	21,8	65,5	76,26	0,45
25.-26.		"				810	4,721	5,245	+ 0,135	3,878	8,311	19,8	59,4	82,14	0,42
Mittelwert		5,380			0,524		4,650	5,174	+ 0,206	3,598	7,704	20,7	62,1	77,37	0,45

Tabelle III (Fortsetzung).

Datum	Behandlung und Bemerkungen	N-Einfuhr	Faeces Menge (getrocknet)	Faeces N	Faeces N pro die	Harn Menge	Harn Gesamt-N	Gesamt-N-Ausfuhr	N-Bilanz	Harnstoff-N	Harnstoff	Harnsäure-N	Harnsäure	Quotient (NU:N)×100	Quotient (NÜ:N)×100
		g	g	g	g	ccm	g	g		g	g	mg	mg		
Jan.															
26.-27.		5,380	50,200	2,028	0,507	830	4,650	5,157	+ 0,223	3,630	7,779	23,1	69,4	72,26	0,50
27.-28.		„				850	4,833	5,340	+ 0,040	3,839	8,227	13,1	39,3	79,43	0,27
28.-29.		„				870	4,408	4,915	+ 0,465	3,510	7,522	15,2	45,5	79,62	0,34
29.-30.		„				840	4,796	5,203	+ 0,177	3,836	8,221	16,1	48,2	80,19	0,34
Mittelwert		5,380			0,507		4,672	5,179	+ 0,201	3,704	7,937	16,9	50,7	79,26	0,36
30.-31.	30. I. 9 Uhr morgens 15 ccm $AgNO_3$ n/100 intravenös = 3,24 mg Ag	5,380	50,250	2,476	0,619	815	4,573	5,192	+ 0,188	3,647	7,816	40,3	120,9	79,75	0,88
31. Jan. b. 1. Feb.		„				815	4,878	5,497	+ 0,117	3,819	8,184	29,2	87,5	78,29	0,60
1.-2.		„				830	4,524	5,143	+ 0,237	3,398	7,282	27,2	81,5	75,11	0,60
2.-3.		„				800	4,519	5,138	+ 0,242	3,398	7,282	27,5	82,5	75,19	0,61
Mittelwert		5,380			0,619		4,623	5,242	+ 0,138	3,565	7,641	31,0	93,0	77,11	0,67
3.-4.		5,380	108,00	3,584	0,512	—	—	—	—	3,271	6,999	18,7	56,0	—	—
4.-5.		„				940	4,552	5,064	+ 0,316	3,398	7,282	33,0	99,0	74,65	0,73
5.-6.		„				910	4,861	5,373	+ 0,007	—	—	18,3	55,0	—	0,38
6.-7.		„				870	4,721	5,233	+ 0,147	3,510	7,522	15,9	47,8	74,37	0,34
7.-8.		„				850	4,749	5,261	+ 0,119	3,452	7,398	21,6	64,8	72,69	0,45
8.-9.		„				900	4,313	4,825	+ 0,555	3,080	6,618	18,7	56,0	71,60	0,34
9.-10.		„				830	4,636	5,148	+ 0,232	3,033	6,499	14,2	42,6	65,42	0,31
Mittelwert		5,380			0,512		4,639	5,151	+ 0,229	3,292	7,053	20,1	60,3	70,96	0,43
10.-11.	10. II. 9 Uhr morgens 10 ccm Collargolum Heyden 1:300 intravenös = 16 mg Ag	5,380	37,085	2,136	0,534	840	4,145	4,679	+ 0,701	3,480	7,458	37,5	112,5	83,96	0,90
11.-12.		„				890	4,456	4,990	+ 0,390	3,870	8,293	24,5	73,5	89,65	0,55
12.-13.		„				800	4,367	4,901	+ 0,479	3,331	7,138	19,8	59,4	96,27	0,45
13.-14.		„				810	4,299	4,833	+ 0,547	3,040	6,515	15,7	47,2	70,71	0,37
Mittelwert		5,380			0,534		4,317	4,851	+ 0,529	3,430	7,351	24,4	73,[illegible]	79,46	0,57
14.-15.		5,380	57,500	2,988	0,498	920	4,451	4,949	+ 0,431	3,527	7,558	22,7	68,1	79,24	0,51
15.-16.		„				870	4,670	5,168	+ 0,212	3,647	7,816	16,7	50,2	78,09	0,36
16.-17.		„				900	4,527	5,025	+ 0,355	3,672	7,897	14,3	42,9	81,11	0,32
17.-18.		„				840	4,440	4,938	+ 0,442	3,162	6,776	16,1	48,4	71,05	0,36
18.-19.		„				860	4,617	5,115	+ 0,265	3,690	7,908	15,2	45,6	79,93	0,33
19.-20.		„				810	4,412	4,910	+ 0,470	3,410	7,308	16,7	50,1	77,33	0,38
Mittelwert		5,380			0,498		4,519	5,017	+ 0,363	3,515	7,544	16,9	50,7	77,85	0,37

Tabelle III (Fortsetzung).

Datum	Behandlung und Bemerkungen	N-Einfuhr	Faeces: Menge (getrocknet)	Faeces: N	Faeces: N pro die	Harn: Menge	Harn: Gesamt-N	Gesamt-N-Ausfuhr	N-Bilanz	Harnstoff-N	Harnstoff	Harnsäure-N	Harnsäure	Quotient $(\overset{+}{NU}:N)\times 100$	Quotient $(\overline{NU}:N)\times 100$
		g	g	g	g	ccm	g	g		g	g	mg	mg		
Feb.															
25.-26.	Infolge Auftretens v. Cistitis fällt die Bestimmung d. N-Ausf. v. 20. II. bis 25. II. auf	5,380				800	4,145	5,060	+ 0,320	3,229	6,920	13,9	41,7	77,90	0,34
26.-27.		„				870	4,425	5,340	+ 0,040	3,690	7,908	14,0	42,1	83,38	0,32
27.-28.		„				910	4,299	5,214	+ 0,166	3,145	6,740	18,1	54,4	73,15	0,42
28. Feb. bis 1. März		„	135,825	5,492	0,915	850	4,342	5,257	+ 0,123	3,410	7,308	18,3	55,0	78,53	0,42
1.-2.		„				830	4,440	5,355	+ 0,025	3,480	7,458	15,3	45,9	78,37	0,34
2.-3.		„				810	4,440	5,355	+ 0,025	3,554	7,616	15,4	46,2	80,04	0,35
Mittelwert		5,380			0,915		4,348	5,263	+ 0,117	3,418	7,325	15,8	47,4	78,61	0,36
3.-4.	9 Uhr morg. 10 ccm $AgNO_3$ n/100 intravenös = 10,8 mg Ag	5,380				890	4,931	5,740	— 0,360	4,008	8,589	22,9	68,7	81,28	0,46
4.-5.		„	117,120	3,268	0,817	840	5,212	6,029	— 0,649	4,612	9,884	31,3	94,0	88,49	0,60
5.-6.		„				800	5,409	6,226	— 0,846	4,819	10,327	20,6	61,9	89,09	0,38
6.-7.		„				830	4,552	5,369	+ 0,011	3,822	8,191	23,0	69,0	83,96	0,50
Mittelwert		5,380			0,817		5,026	5,843	— 0,463	4,315	9,248	24,4	73,2	87,85	0,50
7.-8.		5,380				810	4,735	5,126	+ 0,254	3,810	8,293	35,5	106,6	80,46	0,75
8.-9.		„				910	4,229	4,690	+ 0,690	3,610	7,726	21,7	65,0	83,97	0,54
9.-10.		„	50,110	1,956	0,391	870	4,454	4,845	+ 0,535	3,610	7,726	27,2	81,6	81,05	0,61
10.-11.		„				860	4,468	4,859	+ 0,521	3,480	7,458	11,7	35,2	77,43	0,26
11.-12.		„				900	4,088	4,479	+ 0,901	3,092	6.626	17,9	53,7	75,64	0,44
Mittelwert		5,380			0,391		4,409	4,800	+ 0,580	3,520	7,566	22,8	68,4	79,83	0,52
12.-13.	12. III. 9 Uhr morg. 15 ccm Silberthiosulfat n/100 intravenös = 3,24 mg Ag	5,380				830	4,336	5,148	+ 0,232	3,430	7,350	13,8	41,4	79,10	0,32
13.-14.		„	94,310	3,248	0,812	810	4,260	5,072	+ 0,308	3,417	7,323	16,3	48,9	80,21	0,38
14.-15.		„				790	4,280	5,092	+ 0,288	3,441	7,374	17,6	52,8	80,86	0,41
15.-16.		„				850	4,280	5'092	+ 0,288	3,162	6,776	13,4	40,2	73,85	0,37
Mittelwert		5,380			0,812		4,289	5,101	+ 0,279	3,362	7,206	15,3	45,9	78,41	0,36
16.-17.		5,380				890	4,540	5,459	— 0,079	3,370	7,222	14,3	42,9	74,23	0,32
17.-18.		„	89,267	3,676	0,919	910	4,616	5,553	— 0,173	3,417	7,323	15,2	45,3	74,02	0,33
18.-19.		„				830	4,379	5,298	+ 0,082	3,331	7,138	13,7	41,1	76,07	0,31
19.-20.		„				850	4,417	5,336	+ 0,044	3,480	7,458	14,0	42,0	78,79	0,32
Mittelwert		5,380			0,919		4,488	5,407	— 0,027	3,399	7,285	14,3	42,9	75,74	0,32

Tabelle III (Fortsetzung).

Datum	Behandlung und Bemerkungen	N-Einfuhr g	Faeces: Menge (getrocknet) g	Faeces: N g	Faeces: N pro die g	Harn: Menge ccm	Harn: Gesamt-N g	Gesamt-N-Ausfuhr g	N-Bilanz	Harnstoff-N g	Harnstoff g	Harnsäure-N mg	Harnsäure mg	Quotient + (NÜ:N)×100	Quotient (NÜ:N)×100
März															
20.-21.	20. III. 9 Uhr morg. 10 ccm Silberthiosulfat $^{n}/_{100}$ intravenös = 10,8 mg Ag	5,380	49,200	2,064	0,516	890	4,419	4,933	+ 0,447	3,690	7,908	21,4	64,2	83,66	0,49
21.-22.		„				950	5,070	5,586	– 0,206	4,377	9,380	29,0	87,0	86,33	0,57
22.-23.		„				900	5,211	5,727	– 0,347	4,396	9,421	38,3	114,9	84,36	0,74
23.-24.		„				830	5,020	5,536	– 0,156	4,107	8,801	35,7	107,1	81,81	0,71
Mittelwert		5,380			0,516		4,930	5,446	– 0,066	4,142	8,877	31,1	93,3	84,02	0,63
24.-25.		5,380	55,600	2,460	0,615	810	4,730	5,345	+ 0,045	3,870	8,293	31,4	94,2	81,82	0,66
25.-26.		„				840	4,134	4,749	+ 0,631	3,162	6,776	20,2	60,6	76,48	0,49
26.-27.		„				870	4,062	4,677	+ 0,703	3,210	6,879	14,8	44,4	79,02	0,36
27.-28.		„				900	4,114	4,729	+ 0,651	3,092	6,626	15,7	47,1	75,15	0,38
Mittelwert		5,380			0,615		4,260	4,875	+ 0,505	3,334	7,143	20,5	61,5	78,47	0,48
28.-29.	28. III 9 Uhr morgens 10 ccm Silberalbuminat intravenös = 11,3 mg Ag	5,380	42,117	1,963	0,491	830	5,019	5,510	– 0,130	4,377	9,380	24,1	72,3	87,20	0,48
29.-30.		„				900	5,717	6,208	– 0,828	4,819	11,327	27,0	81,0	84,28	0,47
30.-31.		„				870	5,434	5,925	– 0,545	4,612	9,884	31,0	93,0	84,84	0,57
31. März bis 1. April		„				880	5,078	5,569	– 0,189	4,324	9,267	29,0	87,0	85,15	0,57
Mittelwert		5,380			0,491		5,312	5,803	– 0,423	4,533	9,714	27,8	83,4	85,34	0,52
1.-2.		5,380	59,714	2,535	0,507	860	4,130	4,637	+ 0,743	3,630	7,779	25,0	75,0	87,89	0,61
2.-3.		„				900	3,765	4,272	+ 1,108	2,808	6,018	17,4	52,2	74,58	0,46
3.-4.		„				850	3,497	4,004	+ 1,376	2,615	5,604	13,6	40,8	74,78	0,39
4.-5.		„				860	4,060	4,567	+ 0,813	2,995	6,416	15,9	47,7	73,74	0,39
5.-6.		„				850	4,198	4,705	+ 0,675	3,274	7,016	15,3	45,9	77,99	0,36
Mittelwert		5,380			0,507		3,930	4,437	+ 0,943	3,064	6,566	17,4	52,2	77,97	0,44

Tabelle IV.
Hündin Nr. 1.

		Dauer der Periode in Tagen Datum	Gewicht kg	Gesamt-N-Einfuhr N pro die	Gesamt-N im Kot N pro die	Gesamt-N im Harn N pro die	Gesamt-N Ausfuhr N pro die	N-Bilanz	Gesamt-$\overset{+}{U}N$ $\overset{+}{U}N$ pro die g	Gesamt-$\overset{-}{U}N$ $\overset{-}{U}N$ pro die g	$\frac{\overset{+}{U}N}{N} \times 100$	$\frac{\overset{-}{U}N}{N} \times 100$
Vorperiode		Okt. 5 16.-21.	7,390	25,220 5,044	2,094 0,419	22,575 4,515	24,669 4,934	+ 0,561 + 0,110	18,020 3,604	58,8 11,7	79,82	0,26
Ag-Hydrosol, nicht stabilisiert	Versuchsperiode	4 21.-25.	7,370	20,176 5,044	2,760 0,690	16,753 4,188	19,513 4,878	+ 0,663 + 0,166	13,984 3,496	45,9 11,5	83,47	0,27
	Nachperiode	10 25. Okt. b.4.Nov.	7,380	50,440 5,044	4,510 0,451	45,323 4,532	49,833 4,983	+ 0,607 + 0,061	36,166 3,617	110,9 11,1	79,81	0,24
Ag-Hydrosol, stabilisiert	Versuchsperiode	4 4.-8.	7,380	20,176 5,044	0,716 0,179	22,186 5,547	22,902 5,726	− 2,726 − 0,682	20,193 5,048	143,7 35,9	91,00	0,65
	Nachperiode	6 8.-14.	7,340	30,264 5,044	0,640 0,107	25,044 4,174	25,684 4,281	+ 4,580 + 0,763	19,404 3,234	118,0 19,7	77,48	0,47
Collargolum, starke Dosis	Versuchsperiode	4 14.-18.	7,360	20,176 5,044	2,124 0,531	16,217 4,054	18,341 4,585	+ 1,835 + 0,459	14,226 3,556	65,9 16,5	87,71	0,41
	Nachperiode	4 18.-22.	7,350	20,176 5,044	3,116 0,779	17,509 4,377	20,625 5,156	− 0,449 − 0,112	13,254 3,313	48,0 12,0	75,69	0,27
$AgNO_3$, starke Dosis	Versuchsperiode	4 22.-26.	7,340	20,176 5,044	2,032 0,508	20,146 5,037	22,178 5,545	− 2,002 − 0,501	17,323 4,331	77,3 19,3	86,02	0,38
	Nachperiode	4 26.-30.	7,330	20,176 5,044	1,408 0,327	17,013 4,252	18,421 4,579	+ 1,755 + 0,465	13,147 3,287	50,4 12,6	77,30	0,29
Silber-Albuminat, starke Dosis	Versuchsperiode	5 30. Nov. b.5.Dez.	7,310	25,220 5,044	2,305 0,461	25,708 5,141	28,013 5,602	− 2,793 − 0,558	22,227 4,445	125,3 25,1	86,47	0,49
	Nachperiode	6 5.-11.	7,380	30,264 5,044	1,250 0,208	24,642 4,107	25,892 4,315	+ 4,372 + 0,729	15,703 3,141	57,4 11,5	76,48	0,28
Collargolum, geringe Dosis	Versuchsperiode	7 11.-18.	7,360	35,308 5,044	4,485 0,640	29,974 4,382	34,457 4,922	+ 0,851 + 0,122	25,932 3,704	85,3 12,2	84,53	0,28
	Nachperiode	3 18.-21.	7,370	15,132 5,044	2,424 0,808	12,374 4,124	14,798 4,932	+ 0,334 + 0,112	10,288 3,429	33,5 11,2	83,15	0,27
$AgNO_3$, geringe Dosis	Versuchsperiode	6 21.-27.	7,340	30,264 5,044	5,055 0,843	25,868 4,311	30,923 5,154	− 0,659 − 0,110	20,760 3,460	106,8 17,8	80,26	0,41
	Nachperiode	4 27.-31.	7,340	20,176 5,044	1,512 0,378	16,948 4,237	18,460 4,615	+ 1,716 + 0,429	13,343 3,336	39,4 9,8	78,73	0,23

Tabelle IV (Fortsetzung).

		Dauer der Periode in Tagen Datum	Gewicht kg	Gesamt-N-Einfuhr N pro die	Gesamt-N in Kot N pro die	Gesamt-N im Harn N pro die	Gesamt-N-Ausfuhr N pro die	N-Bilanz	Gesamt-$\overset{+}{U}$N $\overset{+}{U}$N pro die g	Gesamt-$\overset{-}{U}$N $\overset{-}{U}$N pro die g	$\frac{\overset{+}{U}N}{N} \times 100$	$\frac{\overset{-}{U}N}{N} \times 100$
Silber-Thiosulfat, geringe Dosis	Versuchsperiode	8 31. Dez. b. 8. Jan.	7,340	40,352 5,044	3,064 0,383	36,719 4,589	39,783 4,972	+ 0,569 + 0,072	28,875 3,609	83,3 10,4	80,41	0,23
	Nachperiode	3 8.-11.	7,350	15,132 5,044	1,284 0,428	13,495 4,498	14,779 4,926	+ 0,353 + 0,118	10,624 3,541	37,7 12,6	78,73	0,28
Silber-Thiosulfat, starke Dosis	Versuchsperiode	6 11.-17.	7,340	30,264 5,044	1,974 0,329	29,820 4,970	31,794 5,299	− 1,530 − 0,255	24,847 4,141	190,7 31,8	83,32	0,64
	Nachperiode	3 17.-20.	7,340	15,132 5,044	0,945 0,315	12,570 4,190	13,515 4,505	+ 1,617 + 0,539	10,125 3,375	42,4 14,1	80,55	0,34

Tabelle V.

Hündin Nr. 2.

		Dauer der Periode in Tagen Datum	Gewicht kg	Gesamt-N-Einfuhr N pro die	Gesamt-N im Kot N pro die	Gesamt-N im Harn N pro die	Gesamt-N-Ausfuhr N pro die	N-Bilanz	Gesamt-$\overset{+}{U}$N $\overset{+}{U}$N pro die g	Gesamt-$\overset{-}{U}$N $\overset{-}{U}$N pro die g	$\frac{\overset{+}{U}N}{N} \times 100$	$\frac{\overset{-}{U}N}{N} \times 100$
Vorperiode		Dez. 6 17.-23.	8,510	32,280 5,380	3,880 0,647	26,765 4,461	30,645 5,108	+ 1,635 + 0,272	21,241 3,540	90,4 15,1	79,33	0,34
Ag-Hydrosol, nicht stabilisiert	Versuchsperiode	4 23.-27.	8,490	21,520 5,380	2,700 0,675	18,410 4,603	21,110 5,278	+ 0,410 + 0,102	14,395 3,598	56,0 14,0	78,16	0,30
	Nachperiode	3 27.-30.	8,530	16,140 5,380	2,277 0,759	13,589 4,529	15.876 5,289	+ 0,264 + 0,091	11,290 3,763	45,3 15,1	83,08	0,33
Ag-Hydrosol, stabilisiert	Versuchsperiode	4 30. Dez. bis 3. Jan.	8,500	21,520 5,380	1,020 0,255	22,655 5,664	23,675 5,919	− 2,155 − 0,539	19,678 4,919	152,8 50,9	86,85	0,90
	Nachperiode	4 3.-7.	8,470	21,520 5,380	0,620 0,155	16,853 4,213	17,473 4,368	+ 4,047 + 1,012	13,562 3,390	141,9 47,3	80,46	1,12
Collargolum, geringe Dosis	Versuchsperiode	4 7.-11.	8,480	21,520 5,380	3,348 0,837	17,399 4,350	20,747 5,187	+ 0,773 + 0,193	13,281 3,320	63,0 15,6	76,32	0,36
	Nachperiode	2 11.-13.	8,500	10,760 5,380	1,448 0,724	9,097 4,549	10,545 5,273	+ 0,215 + 0,107	6,935 3,468	35,0 17,5	76,24	0,38

Fortsetzung der Tabelle V.

		Dauer der Periode in Tagen Datum	Gewicht kg	Gesamt-N-Einfuhr N pro die	Gesamt-N im Kot N pro die	Gesamt-N im Harn N pro die	Gesamt-N-Ausfuhr N pro die	N-Bilanz	Gesamt-$\overset{+}{U}$ N $\overset{+}{U}$ N pro die g	Gesamt-$\overset{-}{U}$ N $\overset{-}{U}$ N pro die g	$\frac{\overset{+}{U} N}{N} \times 100$	$\frac{\overset{-}{U} N}{N} \times 100$
Vorperiode		Jan. 4 18.-22.	8,500	21,520 5,380	1,961 0,490	18,036 4,509	19,997 4,999	+ 1,523 + 0,381	14,528 3,632	59,4 14,8	80,55	0,33
Collargolum, geringe Dosis	Versuchsperiode	4 22.-26.	8,460	21,520 5,380	2,096 0,524	18,601 4,650	20,697 5,174	+ 4,023 + 0,206	14,395 3,598	82,8 20,7	77,37	0,45
	Nachperiode	4 26.-30.	8,490	21,520 5,380	2,028 0,507	18,687 4,672	20,715 5,179	+ 0,805 + 0,201	14,815 3,704	67,5 16,9	79,26	0,36
$AgNO_3$, geringe Dosis	Versuchsperiode	4 30. Jan. bis 3. Febr.	8,450	21,520 5,380	2,476 0,619	18,494 4,623	20,970 5,242	+ 0,550 + 0,138	14,262 3,565	124,2 31,0	77,11	0,67
	Nachperiode	7 3.-10.	8,455	37,660 5,380	3,584 0,512	32,173 4,639	36,057 5,151	+ 1,603 + 0,229	19,752 3,292	140,4 20,1	70,96	0,43
Collargolum, starke Dosis	Versuchsperiode	4 10.-14.	8,480	21,520 5,380	2,136 0,534	17,267 4,317	19,403 4,851	+ 2,117 + 0,529	13,721 3,430	97,5 24,4	79,46	0,57
	Nachperiode	6 14.-20.	8,490	32,280 5,380	2,988 0,498	27,117 4,519	30,105 5,017	+ 2,175 + 0,363	21,108 3,518	101,7 16,9	77,85	0,37
Vorperiode		6 25. Febr. bis 3. März	8,460	32,280 5,380	5,492 0,915	26,091 4,348	31,583 5,263	+ 0,697 + 0,117	20,508 3,418	95,0 15,8	78,61	0,36
$AgNO_3$, starke Dosis	Versuchsperiode	4 3.-7.	8,480	21,520 5,380	3,268 0,817	20,104 5,026	23,372 5,843	– 1,852 – 0,463	17,261 4,315	97,8 24,4	87,85	0,50
	Nachperiode	5 7.-12.	8,470	26,900 5,380	1,956 0,391	22,044 4,409	24,000 4,800	+ 2,900 + 0,580	17,602 3,520	114,0 22,8	79,83	0,52
Silber-Thiosulfat, geringe Dosis	Versuchsperiode	4 12.-16.	8,480	21,520 5,380	3,248 0,812	17,156 4,289	20,404 5,101	+ 1,116 + 0,279	13,450 3,362	61,1 15,3	78,41	0,36
	Nachperiode	4 16.-20.	8,460	21,520 5,380	3,676 0,919	17,952 4,488	21,628 5,407	– 0,108 – 0,027	13,598 3,399	57,1 14,3	75,74	0,32
Silber-Thiosulfat, starke Dosis	Versuchsperiode	4 20.-24.	8,490	21,520 5,380	2,064 0,516	19,720 4,930	21,784 5,446	– 0,264 – 0,066	16,570 4,142	124,4 31,1	84,02	0,63
	Nachperiode	4 24.-28.	8,470	21,520 5,380	2,460 0,615	17,040 4,260	19,500 4,875	+ 2,020 + 0,505	13,334 3,334	82,1 20,5	78,47	0,48
Silber-Albuminat, starke Dosis	Versuchsperiode	4 28. März b. 1. Apr.	8,460	21,520 5,380	1,963 0,491	21,248 5,312	25,211 5,803	– 3,691 – 0,423	18,132 4,533	111,1 27,8	85,34	0,52
	Nachperiode	5 1.-6.	8,440	26,900 5,380	2,535 0,507	19,650 3,930	22,185 4,437	+ 4,715 + 0,943	15,321 3,064	87,2 17,4	77,97	0,44

Zur Kenntnis der hämolytischen Amboceptoren und ihrer Beziehungen zu den Receptoren der Erythrocyten.

Von

Peter Philosophow, St. Petersburg.

(Aus der bakteriologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 27. März 1909.)

Seit dem Entstehen von P. Ehrlichs Receptorentheorie ist die Immunitätslehre ein Teil der Biologie im weiten Sinne des Wortes geworden. Die Beteiligung der Receptoren des Zellprotoplasmas an den verschiedenen Funktionen der Zelle: an der Assimilation der Nährsubstanzen, an der Bindung der Produkte der inneren Sekretion usw. sowie die Rolle der Receptoren bei der verhängnisvollen Wirkung der Gifte auf die Zelle selbst verbindet alle diese Erscheinungen zu einem Ganzen. Die Prozesse der Ernährung, der Resorption neugebildeter und hyperplastischer Gewebe, die Fähigkeit des Organismus, die in denselben eingeführten fremden Zellen zu zerstören — dies alles sind Erscheinungen ein und derselben Ordnung, die in engem Zusammenhange mit der Receptorenformel des Zellprotoplasmas stehen.

Vor allem die Lehre der spezifischen Hämolysine gab die Möglichkeit, in die Struktur der Immunkörper und in den Mechanismus ihrer Wirkung tiefer einzudringen. So wissen wir aus den Versuchen von Bordet (1), daß die Hämolysine keine einfachen Substanzen, sondern komplizierte sind, daß dieselben aus zwei Komponenten bestehen, von denen die eine in der Regel thermostabil (die eigentliche Immunsubstanz, Amboceptor nach Ehrlich und Morgenroth) ist, während die andere fast immer thermolabil ist und bei 56° C innerhalb $^1/_2$ Stunde zerstört wird (Komplement nach Ehrlich und Morgenroth).

Die Experimente von Ehrlich und Morgenroth (2) haben ergeben, daß der hämolytische Amboceptor beim Prozeß der Hämolyse durch seine cytophile Gruppe sich mit dem Receptor des roten Blutkörperchens verbindet, während das Komplement mit der komplementophilen Gruppe des Amboceptors in Beziehung tritt. Aus den Untersuchungen derselben Autoren ergab sich, daß jede Immunsubstanz ein Produkt der Einwirkung des Antigens auf das Zellprotoplasma des immunisierten Tieres, und daß sie nicht in zoologischem bzw. individuellem Sinne, sondern im Sinne der Receptoren spezifisch ist.

Zugleich zeigte es sich, daß die Zahl der Receptoren bei den roten Blutkörperchen sehr groß ist, daß dieselben außerordentlich verschiedenartig sind, daß den Blutkörperchenreceptoren vollkommen analoge Gruppen auch in anderen Zellen des Organismus vorkommen (cf. die Arbeit von v. Dungern (4). Ehrlich (5) ist der Meinung, daß das Vorhandensein eines gewaltigen Receptorenapparates in den roten Blutkörperchen durch die Bedürfnisse ihrer „Vita minima" allein nicht erklärt werden kann; vielmehr ist er der Ansicht, daß die Erythrocyten nicht nur Träger des Sauerstoffes für den Bedarf der Gewebe, sondern auch Speicherungszentren in dem Sinne sind, daß sie aus dem Plasma alle möglichen Substanzen (aus der Nahrung und aus der inneren Sekretion des Organismus) aufnehmen, sie durch die Gewebe tragen und denjenigen Zellen übermitteln, die im jeweiligen Moment dieselben benötigen. Diese Wechselbeziehungen zwischen den Erythrocyten und den Geweben werden durch Steigerung und Herabsetzung der Avidität der Gewebsreceptoren der einen oder der anderen chemischen Substanz gegenüber bedingt. Diese Betrachtungsweise läßt annehmen, daß die Struktur des Protoplasmas der roten Blutkörperchen der Struktur des Protoplasmas der übrigen Zellelemente analog ist, und gibt somit das Recht, vom Studium der Receptorenverhältnisse der Erythrocyten fruchtbringende Resultate auch für die Aufklärung der Erscheinungen des Zelllebens überhaupt zu erwarten. Von diesem Standpunkte aus ist das eingehende Studium der Hämolysine in gleicher Weise wichtig sowohl für die Immunitätslehre, wie auch für die Biologie überhaupt.

Was wissen wir in der Tat von den Bedingungen der Assi-

milation, der Ernährung, der Zerstörung und des ganzen Lebens des Zellprotoplasmas? Fast nichts. Die Ursache dieser Erscheinung liegt einerseits in der Schwierigkeit, widerstandsfähige Zellen von relativ einfachen Funktionen in vivo zu isolieren und zu beobachten, andererseits darin, daß wir von denjenigen Substanzen außerordentlich wenig wissen, die vom lebenden Protoplasma aufgenommen und eliminiert werden. Beim Prozeß der spezifischen Hämolyse haben wir es nun gerade mit einer isolierten Zelle zu tun, welche die Eigenschaften des lebenden Protoplasmas zeigt und mit einem Amboceptor — dem Produkt der Lebensfunktion einer anderen Zelle, d. h. mit einer zweifellos einfacheren Substanz als lebendes Eiweiß — in Beziehung tritt, welche ihrerseits als eine Substanz anzusehen ist, die schon ihrem Ursprunge nach dazu geeignet ist, vom Receptorensystem der betreffenden Erythrocyten aufgenommen zu werden. Das Studium der Wechselbeziehungen dieser beiden Elemente in verschiedenen quantitativen Kombinationen und unter verschiedenen Bedingungen wird dadurch erleichtert, daß in jedem beliebigen Moment die Möglichkeit besteht, diese Wechselbeziehung durch Anwendung der Reaktion der Hämolyse zu kontrollieren, die nach Zusatz von Komplement eintritt.

Das sind die Betrachtungen, die mich veranlaßt haben, der Anregung von Prof. J. Morgenroth folgend und unter dessen Leitung mich mit diesen Fragen zu beschäftigen.[1]) Als Richtschnur bei der Wahl des Weges, den ich bei meinen Untersuchungen zu gehen hatte, dienten mir die Experimente der letzten Jahre, die gezeigt haben, welche gewaltige Bedeutung im Leben der Zellen die Temperatur und die chemische Zusammensetzung der Umgebung haben. So hat J. Loeb (6) durch eine Reihe geistreicher Experimente an Seetieren und deren Eiern durch Änderungen des Mediums festgestellt, daß das Medium, bei dem sie am besten leben und sich am besten entwickeln können, eine Kombination der Natriumsalze mit Calcium- und Kaliumsalzen ist, und daß dieselben Kombinationen die isolierten Organe am besten im lebenden Zustande erhalten. Den Sinn dieser Erscheinungen erblickt er darin, daß die einwertigen

[1]) Die Versuche wurden zum Teil aus Mitteln der Gräfin Bose-Stiftung bestritten, die Herrn Prof. Morgenroth gewährt waren.

Ionen, wie Natrium und Kalium, das lebende Gewebe schädigen, während zweiwertige Ionen, wie Calcium, eine Schutzwirkung ausüben.

S. von Poggenpohl, der gleichzeitig mit mir in ein und derselben Richtung gearbeitet hat, hat nachgewiesen, daß die Bindung des hämolytischen Amboceptors an die roten Blutkörperchen nicht momentan, wie man es bis jetzt in der Wissenschaft angenommen hat und in der Mehrzahl der Lehrbücher auch angegeben wird[1]), sondern innerhalb eines bedeutenden Zeitraumes vor sich geht und in engem Zusammenhange mit der Temperatur der Umgebung steht: je höher die Temperatur (in biologischen Grenzen), desto rascher geht dieser Prozeß vor sich und umgekehrt. Nachdem er die Reaktion der Bindung des hämolytischen Amboceptors an Erythrocyten in isotonischen Lösungen von verschiedenen Salzen und von Rohrzucker anstellte, ist Verfasser zu dem Schlusse gelangt, daß die Bindung in manchen Lösungen rascher und vollständiger, in anderen langsam und weniger vollkommen vor sich geht.

Als Methode für meine Untersuchungen bediente ich mich des Phänomens, welches für die spezifische Hämolyse zum erstenmal von J. Morgenroth (8) im Jahre 1903 unter der Bezeichnung „Überspringungsversuch" beschrieben wurde und in folgendem besteht. Gewöhnlich ist der hämolytische Amboceptor, nachdem er mit den entsprechenden Erythrocyten verbunden ist, nicht imstande, sich von denselben abzuspalten und in das umgebende Medium überzutreten. Die Fähigkeit des Amboceptors, die einmal eingegangene Bindung aufzuheben, tritt nur dann ein, wenn zu den mit Amboceptoren beladenen Erythrocyten eine neue Partie derselben roten Blutkörperchen hinzugesetzt wird, deren Receptorengruppen frei sind. Diese interessante Erscheinung ist gleichsam ein reales Beispiel für diejenigen biologischen Funktionen, die P. Ehrlich allein a priori den roten Blutkörperchen in der Verteilung der Nähr- und anderer Substanzen im Organismus beimißt (siehe oben).

Die Beobachtung J. Morgenroths bestand eigentlich in folgendem: Bekanntlich sind die roten Blutkörperchen imstande,

---

[1]) cf. Hans Sachs, Die Hämolysine und die cytotoxischen Sera, Wiesbaden 1907, S. 565.

durch ihre Receptoren eine bis um das Hundertfache größere Quantität hämolytischen Amboceptors zu binden, als zu ihrer vollständigen Lösung erforderlich ist. Würde man nun zu einer bestimmten Quantität einer 5%igen Aufschwemmung von roten Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung das 130fache der Quantität hämolytischen Amboceptors hinzufügen, als zu deren Auflösung erforderlich ist, und würde man die Aufschwemmung für 1 Stunde in den Brutschrank (37°) bringen, so wird eine mehr oder weniger vollständige Sättigung der Receptorengruppen der roten Blutkörperchen mit Amboceptor stattfinden. Würde man nun die Erythrocyten von den Überresten des ungebundenen Amboceptors befreien und zu einer Quantität derselben, die 1 ccm einer 5%igen Aufschwemmung von reinem Blut entspricht, eine neue gleiche Portion von frischen Blutkörperchen hinzufügen und das Gemisch im Wasserbad von einer Temperatur von 40° C für 1 Stunde belassen, so würde nach Zusatz von Meerschweinchenserum in einer Quantität von 0,2 ccm nach 15 Minuten im Brutschrank vollständige Auflösung des gesamten Blutes eintreten. Bei 0° geht dieser Prozeß des Überganges langsamer vor sich. Diese Erscheinung hat Verfasser nicht nur bei vollständiger Sättigung der Receptorengruppen mit Amboceptor, sondern auch bei 60, 10, 6 und sogar 3 auflösenden Dosen beobachtet. Verfasser hat auch beobachtet, daß, wenn man Komplement gleichzeitig mit frischem Blut oder sogar früher als 1 Stunde nach dem Zusatz des letzteren hinzufügt, die Auflösung der roten Blutkörperchen keine vollständige und zwar desto weniger vollständig ist, je früher man das Komplement hinzugefügt.

I.

Meine erste Aufgabe war, dieses Phänomen genauer zu erforschen und diejenigen Gesetze zu eruieren, nach denen es sich unter gewöhnlichen Verhältnissen abspielt, da es bisher nur in seinen Grundzügen beschrieben ist. Als Material für meine Untersuchungen diente mir defibriniertes Ziegenblut, welches alle 5 bis 7 Tage auf sterilem Wege aus der Vena jugularis gesunder Tiere gewonnen wurde. Das Blut wurde in dicht geschlossenen Gläsern in einem Eimer mit Eiswasser, welches stets erneuert wurde, aufbewahrt. Gewöhnlich wurde

für die Experimente eine 5 °/₀ige Aufschwemmung der Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung verwendet, welche zuvor in derselben Lösung zweimal gewaschen wurden. Der Amboceptor wurde aus dem hämolytischen Immunserum eines Kaninchens gewonnen, dem zuvor zweimal (das erstemal intravenös, das zweitemal intraperitoneal) defibriniertes Ziegenblut in einer Quantität von 5,0 bzw. 10,0 ccm in Abständen von 7 Tagen injiziert worden war. Das Tier wurde 10 Tage nach der zweiten Injektion auf gewöhnliche Weise entblutet, das Blut in einen sterilisierten, schräg gestellten Zylinder gesammelt und nach Eintritt der Koagulation das Gerinnsel mittels sterilisierten Messers von den Gefäßwandungen abgelöst, damit die Absonderung des Serums eine möglichst vollständige ist. In derselben schrägen Richtung wurde der Zylinder in den Eisschrank gebracht, wo er bis zum folgenden Morgen verblieb. Am folgenden Tage wurde das abgestandene Serum mittels steriler Pipette in gleichfalls sterilisierte Zentrifugiergläschen gebracht und von etwaigen Formelementen abzentrifugiert. Die vollständig klare oder leicht opalescierende Flüssigkeit wurde in sterile Reagensgläschen abgegossen und im Wasserbade während ½ Stunde bei 56° C inaktiviert. Das Serum wurde im Eisschrank aufbewahrt. Als Komplement diente das Serum von Meerschweinchen, welches im „Frigo" in gefrorenem Zustande aufbewahrt wurde. Gewöhnlich behielt ich das Serum nicht länger als 3 Tage in Gebrauch.

Beim Studium der Frage, welche Zeit zum Eintritt der oben beschriebenen Reaktion erforderlich ist, und welche Rolle die Temperatur der Umgebung dabei spielt, benutzte ich zuerst 20 lösende Amboceptordosen.

Ich lasse einige Versuche folgen:

I.

In 4 Zentrifugierröhrchen wurden je 2 ccm einer 5 °/₀igen Aufschwemmung von gewaschenem Ziegenblut in physiologischer Kochsalzlösung gegeben. Zu jedem dieser Röhrchen wurden je 0,01 ccm inaktivierten Kaninchenamboceptors zugesetzt, dessen lösende Einzeldosis für 1 ccm Ziegenblutaufschwemmung bei einer Komplementmenge von 0,1 ccm 0,00025 ccm betrug, d. h. es wurden 20 lösende Dosen zugesetzt. Nach einstündigem Verweilen im Brutschranke bei 37° C wurden die Reagensgläschen zentrifugiert und das Sediment zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, worauf es in jedem Reagensgläschen in 3,0 ccm

Kochsalzlösung wieder aufgeschwemmt wurde. Aus jedem Zentrifugierröhrchen wurden mittels Pipette je 1,5 ccm dieser Aufschwemmung in gewöhnliche Reagensgläschen von 10 ccm Kapazität übertragen und in diese letzteren je 1,0 ccm neuen, gleichfalls zweimal gewaschenen Blutes hinzugefügt. In alle diese 4 Reagensgläschen wurden 0,2 ccm Meerschweinchenserum hinzugefügt, jedoch mit dem Unterschiede, daß in das erste Reagensgläschen das Serum nach 10 Minuten langem Verweilen des Reagensgläschens im Wasserbade bei 40°, in das zweite nach 20 Minuten, in das dritte nach 40 Minuten, in das vierte nach 60 Minuten zugefügt wurde (die Reagensgläschen wurden während dieser Zeit stets geschüttelt). Hierauf wurden die Reagensgläschen in den auf 37° eingestellten Brutschrank auf die Dauer von 2 Stunden gebracht und dann im Eisschrank 24 Stunden lang zum Absetzen belassen. Als Kontrolle dafür, daß die gesamte Amboceptormenge sich mit den roten Blutkörperchen verbunden hat, wurde in allen Experimenten die Untersuchung der nach der Bindung abgegossenen Flüssigkeit auf das Vorhandensein von hämolytischem Amboceptor vorgenommen.

Zu diesem Zwecke wurden zu je 1,5 ccm der jedem Reagensglas entnommenen Flüssigkeit 1,0 ccm einer 5%igen Ziegenblutaufschwemmung und je 0,1 ccm Meerschweinchenserum zugefügt. Das vollständige Fehlen von Hämolyse oder ein äußerst schwacher Grad derselben wies auf vollständige Bindung des Amboceptors hin. Außerdem wurde behufs Untersuchung der Brauchbarkeit des Komplements bei jedem Versuch ein Reagensgläschen, welches 1,0 ccm 5%iger Blutaufschwemmung und 0,1 ccm Meerschweinchenserum enthielt, angesetzt, während ein anderes Reagensgläschen Blut allein (1,0 ccm einer 5%igen Aufschwemmung) enthielt. Weder in dem einen noch in dem anderen Versuche durfte deutliche Hämolyse beobachtet werden. In Anbetracht des Umstandes, daß bei der Hämolyse außer der absoluten Quantität der wirkenden Prinzipien eine große Rolle die Konzentration der Lösung spielt, wurde darauf streng geachtet, daß in sämtlichen Reagensgläschen, die miteinander verglichen werden sollten, ein und dasselbe Volum vorhanden war, was durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung erreicht wurde.

Das Resultat des ersten Experiments war folgermaßen:

Sediment:	Kontrolle:
1. Nach 10 Min. fast komplett	1. 1,0 ccm Zgbl. (5%) + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.
2. „ 20 „ komplett	
3. „ 40 „ „	2. 1,0 ccm Zgbl. (5%) + 0,1 ccm phys. NaCl: Null.
4. „ 60 „ „	

Abguß: 1. bis 4. wenig.

Daraus ersehen wir, daß nach Bindung von fast 20 lösenden Dosen der Übergang unseres Ziegen-Kaninchen-Amboceptors auf die frisch hinzugesetzten Blutkörperchen bei 40° C schon nach etwa 15 Minuten sich vollzogen hat. In Anbetracht des Umstandes, daß die zeitlichen Zwischenräume ziemlich lange waren,

wählte ich dieselben im folgenden Experiment kürzer. Diese Modifikation der Untersuchungsmethodik bezweckte eine genauere Feststellung der für den Eintritt und für den Ablauf der Reaktion erforderlichen Zeit. Im übrigen war die Versuchsanordnung mit derjenigen des ersten Experiments vollkommen identisch.

II.

Sediment:	Kontrolle:
1. Sofort fast komplett	1. 1,0 ccm Zgbl. (5 %) + 0,1 ccm Komplement: fast Null.
2. Nach 5 Min. fast komplett	
3. „ 15 „ komplett	2. 1,0 ccm Zgbl. (5 %) + 0,1 ccm phys. Kochsalzlsg.: Null.
4. „ 30 „ „	

Abguß: 1. bis 4. wenig.

Aus diesem Experiment ersehen wir, daß der Übergang der einen lösenden Dose auf das neu hinzugefügte Blut bei den ursprünglich gebundenen ca. 20 Amboceptordosen sich in einem Zeitraume von 5 und 15 Minuten vollzieht.

Durch den dritten Versuch sollte festgestellt werden, welchen Anteil an diesem Prozeß die Temperatur der Umgebung hat. Die Versuchsanordnung war hier hinsichtlich der Details mit derjenigen des ersten und zweiten Experiments identisch.

Der Übergang des Amboceptors im Wasserbade vollzog sich nicht bei + 40° C, sondern in schmelzendem Eis bei 0°. Das erste Reagensgläschen stand nach dem Zusatz der neuen Blutportion und vor Zusatz des Komplements ein minimales Zeitquantum, das zweite 5 Minuten, das dritte 15, das vierte 30, das fünfte 40 und das sechste 60 Minuten. Das Blut, welches mit dem Amboceptor verbunden war, das neue Blut und das Komplement wurden vor der Vornahme der Reaktion auf 0° abgekühlt.

III.

Sediment:	Kontrolle:
1. Sofort fast komplett	1. 1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.
2. Nach 5 Min. fast komplett	
3. „ 15 „ komplett	2. 1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm phys. Kochsalzlsg.: Null.
4. „ 30 „ „	
5. „ 40 „ „	
6. „ 60 „ „	

Abguß: 1. bis 6. wenig.

Wie aus der vorstehenden Tabelle II ersichtlich, scheinen die Resultate des Übergangs des Amboceptors bei 20 lösenden Dosen vollkommen gleich zu sein, mögen wir die Reaktion bei + 40° C oder bei 0° vor sich gehen lassen. Die Zeitdifferenz zwischen 15 und 5 Minuten ist nun so groß, daß eben innerhalb dieses Zeitraumes eine Differenz in der Schnelligkeit des Eintritts der Reaktion verborgen sein konnte; andererseits mußte man in Anbetracht des Umstandes, daß die Reaktion relativ frühzeitig eingetreten ist, annehmen, daß die Wahl von 20 Dosen eine nicht ganz gelungene war, daß die Amboceptormenge vielleicht zu groß war. Infolgedessen wurde das nächstfolgende Experiment mit 10 lösenden Amboceptordosen angestellt.

IV.

16,0 ccm einer 5%igen Aufschwemmung von Ziegenblut + 0,4 ccm eines 1:10 verdünnten Amboceptors (lösende Dosis 0,00025 ccm) + 7,6 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurden zu gleichen Teilen in 4 Zentrifugierröhrchen verteilt, so daß jedes Reagensgläschen 6,0 ccm Flüssigkeit enthielt, in der 4,0 ccm einer 5%igen Blutaufschwemmung und 40 lösende Amboceptordosen enthalten waren. Die Reagensgläschen standen 1 Stunde im Brutschrank (37°), wobei sie häufig geschüttelt wurden. Hierauf wurden sie zentrifugiert, abgegossen, das Sediment sorgfältig mittels Löschpapiers von Flüssigkeitsresten befreit und zu jedem Reagensgläschen 6,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung wieder zugegeben, dann in 14 gewöhnlichen Reagensgläschen zu 0,5 ccm verteilt, so daß jedes Reagensgläschen je 1,0 ccm einer 5%igen Blutaufschwemmung in Verbindung mit 10 Amboceptordosen enthielt. 7 von den 14 Reagensgläschen wurden in das Wasserbad bei 40° C, die übrigen 7 in eine Mischung von Wasser und Eis gebracht. Zu der ersten Reihe der Reagensgläschen wurde je 1,0 ccm einer 5%igen Ziegenblutaufschwemmung, welches zuvor auf 40° C erwärmt war, zu der zweiten Reihe gleichfalls 1,0 ccm desselben Blutes, das jedoch bis 0° abgekühlt war, zugesetzt. Die Reagensgläschen 1 und 8 wurden nach dem Zusatz des neuen Blutes und vor dem Zusatz des Komplements (0,2 ccm) einen minimalen Zeitraum, das 2. und 9. je 5 Minuten, das 3. und 10. je 10 Minuten, das 4. und 11. 15 Minuten, das 5. und 12. 30 Minuten, das 6. und 13. 45 Minuten und schließlich das 7. und 14. 60 Minuten in dem Wasserbade bei entsprechender Temperatur gehalten. Der weitere Verlauf des Versuches war der übliche. 1,5 ccm des Abgusses dienten in Verbindung mit 1,0 ccm der 5%igen Blutaufschwemmung und 0,1 ccm Komplement nach zweistündigem Stehen im Brutschrank als Kontrolle für die Bindung des Amboceptors.

Sediment:

Bei 40°.	Bei 0°.
1. Sofort fast komplett	8. Sofort fast komplett
2. Nach 5 Min. fast komplett	9. Nach 5 Min. fast komplett
3. „ 10 „ komplett	10. „ 10 „ „ „
4. „ 15 „ „	11. „ 15 „ stark
5. „ 30 „ „	12. „ 30 „ „
6. „ 45 „ „	13. „ 45 „ „
7. „ 60 „ „	14. „ 60 „ fast komplett

15. 1,5 ccm Abguß + 1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kompl.: wenig.
16. 1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kompl.: Spürchen.
17. 1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm phys. Kochsalzlsg.: Null.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß die Temperatur in dem in Rede stehenden Prozesse eine Rolle spielt: Während bei 40° der Übergang der einen von den 10 lösenden Amboceptordosen auf neu hinzugesetzte 1 ccm einer 5%igen Blutaufschwemmung sich innerhalb 10 Minuten vollzieht, findet bei 0° ein vollständiger Übergang von einer lösenden Dose nicht einmal nach 1 Stunde statt. Diese Differenz wäre natürlich noch augenfälliger gewesen, wenn wir das Experiment nicht mit 10 lösenden Aboceptordosen, sondern mit derjenigen minimalen Amboceptormenge, bei der dieser Übergang überhaupt möglich ist, angestellt hätten. Die nächstfolgende Versuchsreihe wurde infolgedessen auch auf die Bestimmung dieser Minimalquantität gerichtet.

V.

	Je 2,0 ccm 5% Ziegenblut, Gesamtvolumen 3,0 ccm Menge von Zgkan.-Amboc.	Zahl der lösenden Dosen
1.	0,50 $^1/_{1000}$	1 l. D.
2.	0,10 $^1/_{100}$	2 l. D.
3.	0,15 —	3 l. D.
4.	0,20 —	4 l. D.
5.	0,25 —	5 l. D.
6.	0,30 —	6 l. D.
7.	0,35 —	7 l. D.
8.	0,40 —	8 l. D.

Nach einstündigem Stehen im Brutschrank bei 37° C wurden die Reagensgläschen zentrifugiert, das Sediment sorgfältig mittels Löschpapier getrocknet und in jedem Reagensgläschen in 3,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Aus jedem Zentrifugierröhrchen wurden mittels Pipette je 1,5 ccm, d. h. 1 ccm von der 5%igen Blutaufschwemmung in Verbindung mit 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 Amboceptordosen in ge-

wöhnliche Reagensgläschen übertragen. Nach Zusatz von 1,0 ccm von der neuen 5%igen Blutaufschwemmung zu jedem der Reagensgläschen wurden dieselben 1 Stunde im Wasserbad bei 40° gehalten. Hierauf wurden je 0,2 ccm Komplement hinzugesetzt und die Reagensgläschen nach Schütteln für 2 Stunden in den Brutschrank und dann für 24 Stunden in den Eisschrank gebracht. Die Lösung in den Reagensgläschen trat in folgendem Grade ein.

1 l. D. mäßig
2 l. D. „
3 l. D. stark
4 l. D. „
5 l. D. fast komplett
6 l. D. komplett
7 l. D. „
8 l. D. „

Kontrolle:
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kompl.: Spuren.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlsg.: Null.

Zur Kontrolle der Bindung wurden aus jedem Reagensgläschen 1,5 ccm Abguß genommen und zu diesem 1,0 ccm 5%iger Ziegenblutaufschwemmung und 0,1 ccm Komplement hinzugefügt. Nach zweistündigem Stehen im Brutschrank und 24stündigem Stehen im Eisschrank konnten folgende Lösungsstadien festgestellt werden:

1 bis 6 l. D.: Spuren, wenig Kuppe,
7 bis 8 l. D.: wenig, mäßig Kuppe.

Bei einstündigem Stehen im Wasserbad bei 40° vermag unser Ziegen-Kaninchen-Amboceptor in der Menge von einer lösenden Dose auf die neue Portion roter Blutkörperchen von der Ziege nur dann überzugehen, wenn ursprünglich mindestens 6 lösende Dosen gebunden waren. In Anbetracht der Wichtigkeit der Frage wurde dasselbe Experiment mit denselben wirksamen Elementen wiederholt, wobei sich ein vollkommen identisches Resultat ergab.

VI.

1 l. D. }
2 l. D. } mäßig, kleine neue Aufhellung
3 l. D. }
4 l. D. } stark, etwas mehr Aufhellung
5 l. D. fast komplett
6 l. D. komplett
7 l. D. „

Um die Eventualität auszuschalten, daß die Individualität des Amboceptors vielleicht irgend eine Rolle in der Zahl seiner lösenden Dosen, die bei der Bindung für den vollständigen Übergang der einen lösenden Dose auf die neue Blutportion erforderlich sind, spielt, wurde ein analoges Experiment mit

einem anderen Ziegen-Kaninchen-Amboceptor angestellt, dessen lösende Dosis zehnmal so groß war als die des vorigen Amboceptors (0,0025 ccm).

VII.

Die Einzelheiten des Versuches gestalteten sich folgendermaßen:

	Je 2,0 ccm 5% Ziegenblut, Gesamtvolumen 3,0 ccm Menge von Zgkan.-Amboc.	Zahl der lösenden Dosen
1.	0,50 $^1/_{100}$	1 l. D.
2.	0,10 $^1/_{10}$	2 l. D.
3.	0,15 —	3 l. D.
4.	0,20 —	4 l. D.
5.	0,25 —	5 l. D.
6.	0,30 —	6 l. D.
7.	0,35 —	7 l. D.
8.	0,40 —	8 l. D.

In den weiteren Einzelheiten unterschied sich die Anordnung der Versuche in keiner Weise von derjenigen der vorhergehenden beiden Experimente. Die Resultate waren folgende:

Sediment.

1 l. D. kleine Aufhellung
2 l. D. „ „
3 l. D. etwas durchsichtiger
4 l. D. deutliche Trübung
5 l. D. fast komplett
6 l. D. komplett
7 l. D. „
8 l. D. „

Abguß: 1 bis 5 l. D.: Spuren.
6 bis 8 l. D.: wenig.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spuren.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm physiol. Kochsalzlsg.: fast Null.

Der vollständige Übergang einer lösenden Dosis vollzog sich auch bei diesem Amboceptor nur bei 6 ursprünglich gebundenen lösenden Dosen. Daß diese Regel nicht auf beide oben erwähnten Amboceptoren beschränkt bleibt, sondern für eine ganze Reihe Amboceptoren allgemein ist, ergibt sich aus sämtlichen nachfolgenden Experimenten, die ich von dieser Seite nicht einzeln beleuchten und an dieser Stelle nicht bringen will, weil dies mit vielen Wiederholungen verknüpft wäre. Aus dem dritten Teil meiner Arbeit geht hervor, daß diesem Gesetz nicht nur die Immunkörper, welche bei Immunisation von Kaninchen mit Ziegenblut entstehen, unterworfen sind, sondern

auch diejenigen Immunkörper, die durch Immunisation von Kaninchen mit Rinderblut gewonnen werden.

Nachdem ich nun diejenige minimale Amboceptormenge in Erfahrung gebracht habe, bei der eine Abspaltung von einer lösenden Dose möglich ist, konnte ich an das genauere Studium des Einflusses der Zeit und der Temperatur auf diesen Prozeß herangehen.

VIII.

8,0 ccm 5% Ziegenblut, 1,2 ccm Ziegenkaninchen-Amboceptor 1:100 und 2,8 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurden in zwei Zentrifugierröhrchen verteilt und für 1 Stunde in den Brutschrank behufs Bindung gebracht. Da die einzelne lösende Dosis dieses Amboceptors 0,00025 beträgt, so waren also 6 lösende Dosen hinzugefügt. Nach 1 Stunde wurden die Röhrchen zentrifugiert, der Niederschlag mittels Löschpapier von Flüssigkeitsresten befreit und zu jedem Röhrchen 6,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugefügt. Je 1,5 ccm der Aufschwemmung enthielt somit 1,0 ccm Blut in Bindung mit 6 lösenden Amboceptordosen. Der Inhalt eines jeden Zentrifugierröhrchens wurde in gewöhnliche Reagensgläschen zu 1,5 ccm verteilt. Hierauf wurden sämtliche acht Reagensgläschen in ein Wasserbad von 40° C gestellt, und in jedes wurden 1,0 ccm Ziegenblut und dann 0,2 ccm Komplement hineingegeben wobei der Zeitraum zwischen dem Zusatz von neuem Blut und von Komplement verschieden war. In das erste Reagensgläschen wurde das Komplement sofort nach dem neuen Blut, in das zweite nach 2 Minuten, in das dritte nach 5, in das vierte nach 10, in das fünfte nach 15, in das sechste nach 30, in das siebente nach 40 und in das achte nach 60 Minuten hineingegeben. Nach der Hinzufügung des Komplements wurden die Reagensgläschen für 2 Stunden in den Brutschrank und für 24 Stunden in den Eisschrank gebracht. Zur Kontrolle der Bindung wurden 1,5 ccm des Abgusses genommen, mit 1,0 ccm 5%iger Blutaufschwemmung und 0,1 ccm Komplement versetzt, worauf die nach einem zweistündigen Stehen der Flüssigkeit im Brutschrank eingetretene Hämolyse auf den Grad der Bindung hinwies.

Sediment:

1. Sofort	deutliches Durchscheinen, noch viel ungelöste Blutkörperchen
2. Nach 2 Min.	
3. „ 5 „	etwas durchsichtiger
4. „ 10 „	stark
5. „ 15 „	„
6. „ 30 „	fast komplett
7. „ 40 „	komplett
8. „ 60 „	„

Abguß: 1,5 ccm + 1,0 ccm 5% Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: wenig.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spuren.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlsg.: Null.

Wir ersehen daraus, daß der vollständige Übergang der einen lösenden Dosis (von 6 gebundenen Dosen) auf eine neue Blutportion innerhalb eines Zeitraumes zwischen 30 und 40 Minuten vor sich geht, wenn die Temperatur des Mediums 40° C beträgt.

Die nachfolgenden beiden Experimente bestätigen diese Beobachtung und beweisen, welche große Bedeutung die Temperatur des Mediums für den Prozeß hat.

IX.

16,0 ccm Ziegenblut 5% + 2,4 ccm Amboceptor 1:10 + 5,6 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurden in vier Zentrifugröhrchen verteilt, so daß jedes Röhrchen enthielt:

4,0 ccm Ziegenblut,
0,6 ccm Amboceptor (1:100) in
1,4 ccm Kochsalzlösung.

Nach einer einstündigen Bindung im Brutschrank wurden die Röhrchen zentrifugiert, der Abguß in ein Gläschen getan und das Sediment nach vorheriger Austrocknung von Abgußresten mittels Löschpapier in jedem Röhrchen in 6,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, worauf diese ganze Aufschwemmung in 14 gewöhnlichen Reagensgläschen zu 1,5 ccm verteilt wurde. Im weiteren Verlauf war die Versuchsanordnung die übliche, nur mit der Modifikation, daß in den sieben ersten Reagensgläschen der Übergang des Amboceptors bei 40° bewerkstelligt wurde und die Zeit zwischen dem Zusatz von Blut und von Komplement folgendermaßen gewählt war: 2, 4, 10, 20, 30, 45 und 60 Minuten. In den übrigen Reagensgläschen wurde der Übergang des Amboceptors bei 20° C bewerkstelligt und die Zeit um das Zweifache verlängert, so daß dieselbe 4, 8, 20, 40, 60, 90 und 120 Minuten betrug. Die Kontrolle der Bindung bestand in der Prüfung von 1,5 ccm des Abgusses auf Hämolyse.

Sediment:

Bei 40°.		Bei 20°.	
1. Nach 2 Min.	deutl. Aufhellung	8. Nach 4 Min.	fast keine Aufhellung, fast kein Unterschied zwischen 4 u. 120 Min.
2. „ 4 „	etwas mehr	9. „ 8 „	
3. „ 10 „	noch mehr	10. „ 20 „	
4. „ 20 „	stark	11. „ 40 „	
5. „ 30 „	fast komplett	12. „ 60 „	
6. „ 45 „	komplett	13. „ 90 „	
7. „ 60 „	„	14. „ 120 „	

Abguß: 1,5 ccm + 1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spuren.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spuren.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlsg.: Null.

X.

Der Versuch war dem vorhergehenden hinsichtlich seiner Anordnung vollständig analog, wurde aber mit einem anderen Ziegen-Kaninchen-Amboceptor ausgeführt. Da die einzelne lösende Dosis dieses Amboceptors zehnmal größer war als diejenige des vorher benutzten Amboceptors und 0,0025 betrug, so bestand der Unterschied in der Dosierung nur darin, daß auf 16,0 ccm Blut 2,4 ccm nicht $^1/_{100}$, sondern $^1/_{10}$ des Amboceptors genommen wurde. Die Resultate waren fast identisch.

Sediment:

Bei 40°.			Bei 20°.		
1.	Nach 2 Min.	deutl. Aufhellung	8.	Nach 4 Min.	fast keine Aufhellung (8.–11.)
2.	„ 4 „	etwas mehr	9.	„ 8 „	
3.	„ 10 „	deutliche Trübung	10.	„ 20 „	
4.	„ 20 „	fast komplett	11.	„ 40 „	
5.	„ 30 „	„ „	12.	„ 60 „	Aufhellg. etwas mehr, aber fast kein Unterschied zw. 4 u. 120 Min. (12.–14.)
6.	„ 45 „	„ „	13.	„ 90 „	
7.	„ 60 „	komplett	14.	„ 120 „	

Abguß: 1,5 ccm + 1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm physiol. Kochsalzlsg.: Null.

Die Herabsetzung der Temperatur des Mediums auf 20° C unterdrückt somit den Prozeß für die gegebene Zeit bereits vollständig, und während wir bei 40° vollständigen Übergang einer lösenden Dosis in 40 bis 60 Minuten beobachten, wird dieser Übergang bei 20° selbst nach 2 Stunden noch nicht wahrnehmbar.

Um die Untersuchung dieses Phänomens abzuschließen, mußten noch folgende zwei Fragen beantwortet werden: erstens ob ein Übergang von einer lösenden Dosis auch bei einer geringeren Quantität des ursprünglich gebundenen Amboceptors als 6 Dosen möglich ist, wenn wir die Reaktionszeit des Übergangs verlängern; zweitens ob nicht auf die Reaktion des Übergangs diejenige Zeit einen Einfluß hat, während welcher die Verbindung des Amboceptors mit den roten Blutkörperchen bestanden hat, ob nicht diese Bindung bei längerem Bestehen fester wird und deshalb weniger Amboceptor abgespalten wird. Zur Lösung der ersten dieser beiden Fragen wurde eine Reihe von Experimenten angestellt, in denen der Übergang des Amboceptors bei 6 und weniger ursprünglich gebundenen Dosen bei 40° parallel innerhalb 1 und 2 Stunden vor sich ging.

XI.

	Je 2,0 ccm 5 % Ziegenblut, Gesamtvolumen 3,0 ccm Menge von Zgkan.-Amboc.	Zahl der lösenden Dosen
1.	0,10 $^1/_{100}$	2 l. D.
2.	0,15 —	3 l. D.
3.	0,20 —	4 l. D.
4.	0,25 —	5 l. D.
5.	0,30 —	6 l. D.

Nach einstündigem Stehen im Brutschrank wurden die Röhrchen zentrifugiert, das Sediment in jedem Röhrchen in 3,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung geschüttelt. Der Inhalt eines jeden Röhrchens wurde zu gleichen Teilen in zwei Reagensgläschen eingefüllt, so daß man zwei Reihen Reagensgläschen erhielt, welche je 1,0 ccm einer 5 %igen Ziegenblutaufschwemmung in Bindung mit 2, 3, 4, 5 und 6 Amboceptordosen enthielten. Der Übergang des Amboceptors auf das neu hinzugesetzte Blut vollzog sich nach der gewöhnlichen und früher beschriebenen Methode, jedoch mit dem Unterschiede für jede Röhrchenreihe, daß der Übergang des Amboceptors, d. h. die Zeit zwischen dem Zusatz von Blut und demjenigen von Komplement in der ersten Röhrchenreihe 1 Stunde in dem Wasserbade bei 40°, in der zweiten Reihe 2 Stunden bei derselben Temperatur dauerte. Resultat:

Sediment:

Nach 1 Stunde bei 40°.	Nach 2 Stunden bei 40°.
2 l. D. deutliche Aufhellung	2 l. D. deutliche Aufhellung
3 l. D. mehr	3 l. D. mehr
4 l. D. fast komplett	4 l. D. fast komplett
5 l. D. „ „	5 l. D. „ „
6 l. D. komplett	6 l. D. komplett

Abguß: 2 bis 6 l. D.: Spuren.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spuren.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlsg.: Spürchen.

XII.

Der Versuch ist dem XI. analog, jedoch mit dem Unterschiede, daß mit einem anderen Ziegen-Kaninchen-Amboceptor experimentiert wurde, dessen einzelne lösende Dosis 0,0025 ccm betrug. Die Verteilung des Blutes und des Amboceptors in die Zentrifugierröhrchen behufs Bindung, sowie die Wahl der Quantität der lösenden Dosen gestalteten sich folgendermaßen:

	Je 2,0 ccm 5% Ziegenblut, Gesamtvolumen 3,0 ccm Menge von Zgkan.-Amboc.	Zahl der lösenden Dosen
1.	0,50 $^1/_{100}$	1 l. D.
2.	0,10 $^1/_{10}$	2 l. D.
3.	0,15 —	3 l. D.
4.	0,20 —	4 l. D.
5.	0,25 —	5 l. D.
6.	0,30 —	6 l. D.

Im weiteren Verlauf war der Versuch dem XI. analog. Die erzielten Resultate waren einander vollständig ähnlich.

Sediment:

Nach 1 Stunde bei 40°.	Nach 2 Stunden bei 40°.
1 l. D. keine Aufhellung	1 l. D. keine Aufhellung
2 l. D. kleine Aufhellung	2 l. D. kleine Aufhellung
3 l. D. deutliche Aufhellung	3 l. D. deutliche Aufhellung
4 l. D. deutliche Trübung	4 l. D. fast komplett
5 l. D. fast komplett	5 l. D. „ „
6 l. D. komplett	6 l. D. komplett

Abguß: 1 bis 4 l. D.: Spuren.
5 bis 6 l. D.: wenig.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spuren
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlsg.: Null.

XIII.

Versuch mit Ziegen-Kaninchen-Amboceptor, dessen lösende Dosis 0,0025 ccm betrug. Die Verteilung des Blutes und des Amboceptors in die Zentrifugierröhrchen gestaltete sich folgendermaßen:

	je 1,0 ccm 5% Blutmenge, Gesamtvolumen 2,0 ccm Menge von Zgkan.-Amboc.	Zahl der lösenden Dosen
1.	0,50 $^1/_{100}$	2 l. D.
2.	0,75 —	3 l. D.
3.	0,10 $^1/_{10}$	4 l. D.
4.	0,12 —	5 l. D.
5.	0,15 —	6 l. D.

Nach Zentrifugieren und Absonderung des Sediments wurde das letztere in 2,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, in Reagensgläschen gebracht, zu jedem Reagensgläschen 1,0 ccm einer 5%igen Ziegenblutaufschwemmung hinzugefügt, worauf sie sämtlich für 2 Stunden in ein Wasserbad bei 40° gebracht wurden. Hierauf folgten der übliche Zusatz von Komplement in einer Quantität von 0,2 ccm, dann die Übertragung für 2 Stunden in den Brutschrank und für 24 Stunden in den Eisschrank. Die Lösung trat folgendermaßen ein:

Sedimen t.

2 l. D. fast keine Aufhellung
3 l. D. deutliche Aufhellung
4 l. D. deutliche Trübung
5 l. D. fast komplett
6 l. D. wohl komplett

Abguß: 2 bis 4 l. D.: Spuren.
5 bis 6 l. D.: wenig.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spuren
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlsg.: Null.

Wenn man das erzielte Resultat mit denjenigen Befunden vergleicht, die im Experiment VIII mit demselben Amboceptor und denselben Dosen, aber nicht nach einem zweistündigen, sondern nach einem einstündigen Stehen im Wasserbade bei 40° erzielt worden sind, so ersieht man, daß die Resultate fast identisch sind; die sehr zarte Trübung, die bei 6 Dosen im letzten Falle eingetreten ist, muß wahrscheinlich auf das etwas geschwächte Komplement zurückgeführt werden.

Sämtliche Versuche haben durchaus analoge Resultate ergeben, aus denen hervorgeht, daß der Prozeß bei 40° C innerhalb 40 bis 60 Minuten vollständig beendet ist und nicht weiter geht, daß 6 lösende Amboceptordosen diejenige minimale Quantität sind, bei der vollständiger Übergang einer ganzen lösenden Dose auf das neu hinzugesetzte Blut möglich ist.

An die Lösung der Frage, ob die Dauer des vorangegangenen Gebundenseins des Amboceptors an die roten Blutkörperchen auf die Schnelligkeit und Leichtigkeit des Übergangs derselben auf das neu hinzugesetzte Blut von Einfluß ist, suchte ich auf zwei Wegen heranzugehen. Bei der einen Hälfte der Experimente wollte ich in Erfahrung bringen, ob nicht die Dauer der Bindung die Höhe der Minimaldosen beeinflußt, bei denen der Übergang möglich ist; bei der zweiten Hälfte suchte ich festzustellen, ob sie nicht auf die Raschheit des Ablaufs der Reaktion von Einfluß ist.

XIV.

Der Versuch zerfällt in zwei Teile. Die erste Hälfte wurde mit Übergang des Amboceptors unmittelbar nach einer einstündigen Bindung desselben im Brutschrank bei 37°, die zweite aber mit Übergang desselben erst nach 24stündigem Stehen auf Eis in Verbindung mit den

roten Blutkörperchen unmittelbar nach dem üblichen einstündigen Stehen im Brutschrank angestellt. Jede dieser beiden Hälften zerfiel ihrerseits in zwei Abteilungen: in den Versuch mit verschiedenen Amboceptormengen innerhalb einer Stunde auf dem Wasserbade bei 40° und den Versuch mit 6 Amboceptordosen in demselben Wasserbade, jedoch mit verschiedenen Zeitperioden.

1a.

	je 2,0 ccm 5% Blutmenge, Gesamtvolumen 3,0 ccm Menge von Zgkan.-Amboc.	Zahl der lösenden Dosen
1.	0,50 $^1/_{1000}$	1 l. D.
2.	0,10 $^1/_{100}$	2 l. D.
3.	0,15 —	3 l. D.
4.	0,20 —	4 l. D.
5.	0,25 —	5 l. D.
6.	0,30 —	6 l. D.

Im übrigen war die Versuchsanordnung mit derjenigen der Experimente V und VI vollkommen identisch, zum Prozeß des Übergangs des Amboceptors wurde unmittelbar nach einstündiger Bindung geschritten. Der Übergang vollzog sich innerhalb 1 Stunde bei 40°.

Sediment:

1 l. D. fast keine Aufhellung
2 l. D. kleine Aufhellung
3 l. D. durchsichtig
4 l. D. fast komplett
5 l. D. „ „
6 l. D. komplett

Abguß: 1 bis 6 l. D.: Spuren.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spuren.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlsg.: Null.

1b.

10 ccm 5% Ziegenblut, 1,5 ccm Ziegen-Kaninchen-Amboceptor 1:10 + 3,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurden zu gleichen Teilen in zwei Zentrifugröhrchen verteilt. Nach einer einstündigen Bindung im auf 37° eingestellten Brutschrank wurden die Röhrchen zentrifugiert, die Flüssigkeit mittels Löschpapier abgesaugt und in jedem Röhrchen in 7,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Diese Aufschwemmung wurde in acht gewöhnliche Reagensgläschen zu 1,5 ccm verteilt, d. h. jedes Reagensgläschen enthielt 1 ccm 5% Ziegenblut in Verbindung mit 6 Amboceptordosen. Die Reagensgläschen wurden sofort auf das Wasserbad bei 40° behufs Bewerkstelligung der Reaktion des Übergangs gestellt. Im weiteren Verlauf war das Experiment mit dem Experiment VIII identisch.

Sediment:

1. Sofort keine Aufhellung
2. Nach 2 Min. kleine Aufhellung
3. „ 5 „ „ „
4. „ 10 „ etwas durchsichtiger
5. „ 15 „ fast komplett
6. „ 30 „ „ „
7. „ 45 „ komplett
8. „ 60 „ „

Abguß: 1,5 ccm + 1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlsg.: Null.

2a.

Der Versuch entsprach dem Versuch 1a, jedoch mit dem Unterschiede, daß das Blut nach einstündiger Bindung im Brutschrank sich noch in Verbindung mit dem Amboceptor bis zur Reaktion des Übergangs 24 Stunden lang bei 0° befand. Die Amboceptordosen waren gleichfalls etwas größer gewählt, da die Resultate nach dieser Seite abweichen konnten.

	Menge von Zgkan.-Amboc. je 2,0 ccm 5 % Ziegenblut, Gesamtvolumen 3,0 ccm	Zahl der lösenden Dosen
1.	0,05 $^1/_{100}$	1 l. D.
2.	0,10 —	2 l. D.
3.	0,20 —	4 l. D.
4.	0,25 —	5 l. D.
5.	0,30 —	6 l. D.
6.	0,40 —	8 l. D.
7.	0,50 —	10 l. D.

Die Resultate nach einstündigem Übergang bei 40° C waren folgende:

Sediment:	Abguß:
1 l. D. keine Aufhellung	1 l. D. Spürchen
2 l. D. etwas durchsichtig	2 l. D. „
4 l. D. mehr „	4 l. D. „
5 l. D. fast komplett	5 l. D. „
6 l. D. komplett	6 l. D. „
8 l. D. „	8 l. D. Spuren
10 l. D. „	10 l. D. „

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.

2b.

Der Versuch entsprach dem Versuch 1b, jedoch mit dem Unterschiede, daß er nicht unmittelbar nach einstündiger Bindung des Amboceptors, sondern nach 24stündigem Stehen der roten Blutkörperchen in

Verbindung mit dem Amboceptor bei 0° angestellt wurde; außerdem war die Versuchsdauer für einige Reagensgläschen etwas verlängert. Die Reaktion des Übergangs vollzog sich bei 40°. Die erzielten Resultate waren folgende:

Sediment:

1.	Sofort			keine Aufhellung
2.	Nach	2	Min.	kleine Aufhellung
3.	„	5	„	etwas durchsichtiger
4.	„	10	„	„ „
5.	„	15	„	fast komplett
6.	„	30	„	„ „
7.	„	45	„	komplett
8.	„	60	„	„
9.	„	90	„	„
10.	„	120	„	„

Abguß: 1,5 ccm + 1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.

In den folgenden zwei Experimenten wurde zum Zwecke des Vergleichs nur die Methode der verschiedenen Dosen angewendet. Die eine Hälfte eines jeden Experimentes mit Übergang des Amboceptors unmittelbar nach einstündiger Bindung mit den roten Blutkörperchen, die andere Hälfte mit dem Amboceptor, der nach dem Abzentrifugieren des Abgusses sich noch in Verbindung mit roten Blutkörperchen innerhalb 1 Stunde auf dem Wasserbade bei 40° befand.

XV.

1.

	Menge von Zgkan.-Amboc. je 2,0 ccm 5 % Ziegenblut, Gesamtvolumen 3,0 ccm	Zahl der lösenden Dosen
1.	0,50 $^{1}/_{1000}$	1 l. D.
2.	0,10 $^{1}/_{100}$	2 l. D.
3.	0,15 —	3 l. D.
4.	0,20 —	4 l. D.
5.	0,25 —	5 l. D.
6.	0,30 —	6 l. D.

Nach dem Zentrifugieren und der Absonderung des Abgusses wurde das Sediment in jedem Röhrchen in 3,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und dann in zwei gewöhnliche Reagensgläschen zu 1,5 ccm gebracht. Die eine Reihe solcher Reagensgläschen wurde auf ein Wasserbad bei 40° gebracht und in jedes Reagensgläschen 1 ccm 5 % Ziegenblut, und dann nach 1 Stunde je 0,2 ccm Komplement zugefügt. Im weiteren Verlauf war der Gang des Experimentes der gewöhnliche. Die erzielten Resultate waren folgende:

Sediment:	Abguß:
1 l. D. keine Aufhellung	1 l. D. Spürchen
2 l. D. deutliche Aufhellung	2 l. D. „
3 l. D. mehr „	3 l. D. „
4 l. D. fast komplett	4 l. D. „
5 l. D. „ „	5 l. D. Spuren
6 l. D. komplett	6 l. D. „

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.

2.

Die 6 Reagensgläschen der anderen Reihe wurden vor Beginn der Reaktion des Überganges für 1 Stunde auf das Wasserbad bei 40° gebracht. Im übrigen war der Gang des Versuches der nämliche. Resultate fast indentisch.

1 l. D. keine Aufhellung
2 l. D. fast keine Aufhellung
3 l. D. deutliche Aufhellung
4 l. D. mehr „
5 l. D. fast komplett
6 l. D. „ „

XVI.

Der Versuch war dem vorigen vollständig analog, jedoch mit dem Unterschiede, daß mit anderem Ziegen-Kaninchen-Amboceptor experimentiert wurde, dessen einzelne lösende Dosis 0,0025 betrug.

1. Resultate mit dem Amboceptor unmittelbar nach einstündiger Bindung desselben mit roten Blutkörperchen:

Sediment:	Abguß:
1 l. D. keine Aufhellung	1 l. D. Spuren
2 l. D. kleine „	2 l. D. „
3 l. D. etwas durchsichtiger	3 l. D. „
4 l. D. noch mehr durchsichtiger	4 l. D. „
5 l. D. fast komplett	5 l. D. „
6 l. D. „ „	6 l. D. „

1 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spuren.

2. Resultate mit Amboceptor, der nach einstündiger Bindung im Brutschrank (37°) vor der Reaktion des Überganges 1 Stunde in Verbindung mit roten Blutkörperchen bei 40° blieb:

1 l. D. keine Aufhellung
2 l. D. kleine Aufhellung
3 l. D. deutliche Aufhellung
4 l. D. deutliche Trübung
5 l. D. fast komplett
6 l. D. komplett

Aus der Gegenüberstellnng der Resultate aller drei Experimente ersehen wir, daß auf die Festigkeit der Bindung der roten Blutkörperchen mit dem Amboceptor die Dauer dieser Bindung ohne Einfluß bleibt, mag dieselbe bei hoher oder niedriger Temperatur vor sich gehen. Der Prozeß des Überganges des Amboceptors hängt augenscheinlich von der Zeit, während welcher er mit den roten Blutkörperchen in Verbindung war, nicht ab. Die geringe Differenz bei 6 lösenden Dosen in den beiden letzten Experimenten muß augenscheinlich durch eine geringe Ungenauigkeit der Methode erklärt werden, da der Sinn der Veränderungen in den beiden Experimenten einander gerade entgegengesetzt war.

Um die Charakteristik des in Rede stehenden Experimentes vollständig abzuschließen, war es interessant, festzustellen, ob die Notwendigkeit eines Minimums von 6 lösenden Einheiten für den Übergang von einer lösenden Einheit auf das neu hinzugefügte Blut (in einer Quantität von 1,0 ccm einer 5 % igen Aufschwemmung) auch bei größeren Amboceptormengen ihre Gültigkeit behält, mit anderen Worten, ob von 7 lösenden Einheiten sich 2, von 8 3 usw. abspalten.

XVII.

	Je 2,0 ccm 5 % Ziegenblut, Gesamtvolumen 3,0 ccm Menge von Zgkan.-Amboc.	Zahl der lösenden Dosen
1.	0,42 $^1/_{10}$	6 l. D.
2.	0,49 —	7 l. D.
3.	0,56 —	8 l. D.
4.	0,63 —	9 l. D.

Nach einstündigem Stehen im Brutschrank und nach Zentrifugierung wurde das Sediment eines jeden Röhrchens in 3,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Hierauf wurde aus jedem Zentrifugierröhrchen mittels Pipette 1,5 ccm der Aufschwemmung in gewöhnliche Reagensgläschen gebracht. Auf diese Weise enthielt jedes Reagensgläschen in 1,5 ccm Flüssigkeit 1,0 ccm Ziegenblut in Bindung mit 6, 7, 8 und 9 lösenden Amboceptordosen. (Nach der letzten Feststellung betrug die lösende Dosis des Amboceptors 0,0035). Alle 4 Reagensgläschen wurden bei 40° in das Wasserbad gebracht, in jedes derselben neues Ziegenblut in 5 % iger Aufschwemmung mit dem Unterschiede gebracht, daß in das erste Reagensgläschen 1,0 ccm, in das zweite 2,0 ccm, in das dritte 3,0 ccm, in das vierte 4,0 ccm kamen. Nach Verlauf von 1 Stunde, während der die Reagensgläschen alle 5 Minuten geschüttelt wurden, wurde das Komplement mit der Berechnung zugefügt, daß auf

jedes 1 ccm Blut 0,1 ccm Komplement kam, d. h. es wurde in das erste Reagensgläschen 0,2 ccm, in das zweite 0,3 ccm, in das dritte 0,4 ccm und in das vierte 0,5 ccm eingebracht. Nach dem Zusatz des Komplements wurden die Reagensgläschen wie gewöhnlich für 2 Stunden in den Brutschrank und dann für 24 Stunden in den Eisschrank gebracht. Zur Kontrolle der Bindung wurden 1,5 ccm Abguß aus jedem Röhrchen genommen und in der üblichen Weise auf Hämolyse geprüft. Es ergab sich, daß in sämtlichen 4 Reagensglächen, wo der Übergang sich vollzog, Lösung eingetreten ist.

Sediment:	Abguß:
Von 6 bis 9 l. D. komplett.	Von 6 bis 9 l. D. Spürchen.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlösung: Null.

Wir sehen also, daß die Reaktion des Überganges des gebundenen Amboceptors auf neu hinzugesetzte rote Blutkörperchen zu ihrem Zustandekommen einen gewissen Zeitabschnitt und bei geringer Quantität der ursprünglich gebundenen Dosen eine ziemlich hohe Temperatur braucht. Die Minimalquantität, welche für diesen Übergang der einen lösenden Dose auf neu hinzugesetztes Blut erforderlich ist, beträgt 6 ursprünglich gebundene lösende Amboceptordosen. Diese Regel gilt sowohl für Ziegen-Kaninchen-Amboceptor als auch für Ochsen-Kaninchen-Amboceptor, wenn nur der Übergang in physiologischer Kochsalzlösung und bei 40° vor sich geht.

II.

Nachdem sich durch die geschilderten Versuche ein gut erforschter Prozeß darbot, dessen Wirkungsgrenzen unter Bedingungen, die den physiologischen nahestanden, streng festgestellt wurden, und der zur Sphäre der receptorischen Tätigkeit der Zelle gerechnet werden muß, schien es interessant, diesen Prozeß auch unter anderen physikalisch-chemischen Bedingungen zu studieren. Behufs Veränderung der Zusammensetzung des Mediums verwendete ich statt der physiologischen Kochsalzlösung eine isotonische Lösung von anderen Salzen, nämlich des Kaliums und Calciums; als Beispiel eines Mediums, welches freie Ionen nicht enthält, diente mir eine isotonische Lösung von Rohrzucker. Außerdem wurde die Reaktion in 2%iger Kochsalzlösung durchgeführt, welche die roten Blutkörperchen der Warmblüter gewöhnlich vollkommen gut ver-

tragen. Die Rahmen meiner Experimente noch weiter auszudehnen, erlaubte mir meine knappe Zeit nicht.

Die ersten fünf Experimente bezweckten, den Gang des Prozesses vergleichsweise in den haloiden Natrium- und Kaliumsalzen zu studieren.

I.

	Menge des 5 %-Ziegenblutes	Menge des Zgkan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl der lösenden Dosen
1.	2,0 ccm	0,60 $^1/_{100}$	0,40	2 l. D.
2.	—	0,12 $^1/_{10}$	0,88	4 l. D.
3.	—	0,18 —	0,82	6 l. D.
4.	—	0,23 —	0,76	8 l. D.

Die lösende Dosis für Ziegen-Kaninchen-Amboceptor auf 1 ccm Ziegenblut betrug 0,0015.

Zwei Reihen in dieser Weise gefüllter Zentrifugierröhrchen stehen eine Stunde im auf 37° eingestellten Brutschrank, worauf sie zentrifugiert werden und das vom Abguß abgesonderte Sediment in jedem Röhrchen der ersten Reihe in 2,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung, der zweiten Reihe in 2,0 ccm 1,1 %iger Lösung von KCl aufgeschwemmt wird. Zu jedem Röhrchen der ersten Reihe werden 2,0 ccm Ziegenblut in Form einer 5 %igen Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung, zu jedem Zentrifugierröhrchen der zweiten Reihe 2,0 ccm derselben, jedoch mit 1,1 %iger Lösung von KCl verdünnten 5 %igen Blutaufschwemmung hinzugesetzt. Sämtliche Röhrchen werden bei 40° in das Wasserbad gebracht, wo sie unter ständigem Schütteln eine Stunde lang bleiben. Hierauf werden die Röhrchen wieder zentrifugiert und der Niederschlag in jedem Röhrchen in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Aus jedem Röhrchen werden 2,5 ccm genommen und mittels Pipette in zwei entsprechende Reihen Reagensgläschen übertragen. In jedes der Reagensgläschen werden 0,2 ccm Komplement zugefügt, worauf die Reagensgläschen für 2 Stunden in den Brutschrank und dann für 24 Stunden in den Eisschrank gebracht werden. Zur Kontrolle der Bindung diente die Untersuchung des Abgusses auf Hämolyse. Diese Untersuchung bestand darin, daß der Abguß paarweise abgegossen wurde: von 2 lösenden Dosen, von 4, von 6 usw. Aus jedem Reagensgläschen wurden 1,5 ccm entnommen und zu jeder Portion 1,0 ccm 5 %iger Ziegenblutaufschwemmung und 0,1 ccm Komplement zugefügt. Im weiteren Verlaufe blieb die Methodik die übliche.

Sediment:

Versuch in NaCl (0,85 %).		Versuch in KCl (1,1 %).	
2 lösende Dosen	kleine Aufhellung	2 lösende Dosen	komplett
4 „ „	kleine Trübung	4 „ „	„
6 „ „	komplett	6 „ „	„
8 „ „	„	8 „ „	„

Abguß: 2 bis 8 lösende Dosen: Spuren.

1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: Spürchen
1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Kochsalzlösung: fast Null.

II.

Das Experiment ist vollkommen identisch mit dem ersten: dieselben Bestandteile von demselben Datum, dieselbe Dosierung. Das Experiment wurde in drei Reihen von Röhrchon ausgeführt: in physiologischer Kochsalzlösung, in 1,1 % iger Lösung von KCl und 2,42 % iger Lösung von KCl. Die Resultate sind folgende:

Sediment:

Versuch in NaCl (0,85 %):	Versuch in KCl (1,1 %).
2 lösende Dosen deutlich neue Lösung	2 lösende Dosen komplett
4 „ „ kleiner Niederschlag von ungelöst. Blutk.;	4 „ „ „
6 „ „ komplett	6 „ „ „
8 „ „ „	8 „ „ „

Versuch in Kj (2,42 %).

2 lösende Dosen fast komplett
4 „ „ komplett
6 „ „ „
8 „ „ „

Abguß: 2 bis 8 lösende Dosen: Spuren;
1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.
1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 Kochsalzlösung: Null.[1])

III.

Der Versuch ist dem vorhergehenden ähnlich: dieselbe Dosierung, dieselben Bestandteile. Das Experiment wurde in drei Reihen von Zentrifugierröhrchen ausgeführt, in physiologischer Kochsalzlösung, in 1,5 % iger NaBr-Lösung und in 1,7 % iger KBr-Lösung.

Sediment:

Versuch in physiologischer Kochsalzlösung.	Versuch in 1,5 % iger NaBr-Lösung.
2 lös. Dosen fast keine neue Lösung	2 lös. Dosen kleine Aufhellung
4 „ „ deutliche Aufhellung	4 „ „ fastkompl. Lösung
6 „ „ komplette Lösung	6 „ „ komplette Lösung
8 „ „ „ „	8 „ „ „ „

Versuch in KBr-Lösung (1,7 %).

2 lösende Dosen komplette Lösung
4 „ „ „ „
6 „ „ „ „
8 „ „ „ „

Abguß: Von 2 bis 8 lösende Dosen: Spuren.
1,0 ccm Ziegenblut + Komplement: Spuren in der Kuppe.

[1]) Ich möchte nicht unterlassen, zu bemerken, daß in einem Versuch, der unter anscheinend denselben Bedingungen angestellt wurde, der Übergang der Amboceptoren in NaCl und KCl sich fast gleich verhielt.

IV.

Versuch mit einem anderen Amboceptor, dessen lösende Dosis 0,0016 ccm betrug; dementsprechend war die Dosierung des Amboceptors bei der Bindung die folgende:

	Menge des 5%-Ziegen-blutes	Menge des Zgkan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl der lösenden Dosen
1.	2,0 ccm	0,64 $^1/_{100}$	0,36	2 l. D.
2.	—	0,13 $^1/_{10}$	0,87	4 l. D.
3.	—	0,19 —	0,81	6 l. D.
4.	—	0,26 —	0,74	8 l. D.

Die Bindung des Amboceptors geschah in drei Reihen von solchen Röhrchen, der Übergang des Amboceptors wurde in drei Lösungen bewerkstelligt: in physiologischer Kochsalzlösung, in 1,5 % iger Lösung von NaBr und in 1,7 % iger Lösung von KBr.

Sediment:

Versuch in physiologischer Kochsalzlösung.		Versuch in 1,5 % iger NaBr-Lösung.	
2 lös. Dosen	noch deutlicher Niederschlag	2 lös. Dosen	sehr kleiner Niederschlag
4 „ „	wohl komplett	4 „ „	komplett
6 „ „	komplette Lösung	6 „ „	„
8 „ „	„ „	8 „ „	„

Versuch in KBr-Lösung (1,7 %).

2 lösende Dosen komplett
4 „ „ „
6 „ „ „
8 „ „ „

Abguß: 2 bis 8 lösende Dosen: Spuren in der Kuppe.
1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: Spürchen in der Kuppe.

V.

Experiment mit demselben Amboceptor vom 22. V., dessen lösende Dosis nach der letzten Feststellung 0,002 betrug. Dementsprechend war auch die Verteilung des Amboceptors bei der Bindung die folgende:

	Menge des 5%-Ziegen-blutes	Menge des Zgkan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl der lösenden Dosen
1.	2,0 ccm	0,80 $^1/_{100}$	0,20	2 l. D.
2.	—	0,16 $^1/_{10}$	0,84	4 l. D.
3.	—	0,24 —	0,76	6 l. D.
4.	—	0,32 —	0,68	8 l. D.

Der Übergang des Amboceptors wurde nach den üblichen Regeln in physiologischer Kochsalzlösung und in 1,62 % iger Lösung von $CaCl_2$ bewerkstelligt. In Anbetracht des Umstandes, daß Spuren von $CaCl_2$

den Gang der Reaktion der Hämolyse beeinflussen und die Resultate entstellen konnten, wurden die Röhrchen, in denen der Übergang des Amboceptors eben in diesem Salz vor sich ging, hierauf nicht nur einfachem Zentrifugieren und Absonderung von der oben stehenden Flüssigkeitsschicht unterworfen, sondern der Niederschlag wurde in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dann erst auf Lösung geprüft. Im übrigen war der Gang des Experimentes der übliche.

Sediment:

Versuch in physiologischer Kochsalzlösung.	Versuch in 1,62 %iger $CaCl_2$-Lösung.
2 lös. Dosen fast keine neue Lösung	2 lös. Dosen fast komplett
4 „ „ fast komplett	4 „ „ komplett
6 „ „ komplett	6 „ „ „
8 „ „ „	8 „ „ „

Abguß: 2 bis 8 l. D.: Spuren.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spürchen.

VI.

Experiment mit Amboceptor, dessen lösende Dosis 0,009 ccm betrug. Die Dosierung des Amboceptors war infolgedessen die folgende:

	Menge des 5%-Ziegenblutes	Menge des Zgkan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlösung	Zahl der lösenden Dosen
1.	2,0 ccm	0,36 1/100	0,64	2 l. D.
2.	—	0,72 —	0,28	4 l. D.
3.	—	0,12 1/10	0,88	6 l. D.
4.	—	0,14 —	0,86	8 l. D.

Sonst war das Experiment dem vorstehenden völlig analog.

Sediment:

Versuch in physiol. Kochsalzlösung.	Versuch in $CaCl_2$-Lösung (1,62%).
2 l. D. fast keine neue Lösung	2 l. D. fast komplett
4 l. D. stark	4 l. D. komplett
6 l. D. komplett	6 l, D. „
8 l. D. „	8 l. D. „

Abguß: 2 bis 8 l. D.: Spuren.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spuren.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlösung: Null.

VII.

Experiment mit Ziegenkaninchen-Amboceptor, dessen lösende Dosis 0,045 ccm betrug.

	Menge des 5%-Ziegenblutes	Menge des Zgkan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlösung	Zahl der lösenden Dosen
1.	2,0 ccm	0,18 unverdünnt	0,82	2 l. D.
2.	—	0,36 —	0,64	4 l. D.
3.	—	0,54 —	0,46	6 l. D.
4.	—	0,72 —	0,28	8 l. D.

Sonst war das Experiment dem vorstehenden völlig analog.

Sediment:

Versuch in physiol. Kochsalzlösung.	Versuch in $CaCl_2$-Lösung (1,62 %).
2 l. D. fast keine neue Lösung	2 l. D. kleiner Niederschlag von ungelösten Blutkörperchen
4 l. D. fast komplett	4 l. D. komplett
6 l. D. komplett	6 l. D. „
8 l. D. „	8 l. D. „

Abguß: 2 bis 8 l. D.: Spuren.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Null

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlsg.: Null.

Die beiden nächstfolgenden Experimente bezweckten, den Einfluß konzentrierterer Lösungen auf den Gang der Reaktion festzustellen.

VIII.

Der Versuch wurde mit demselben Amboceptor, mit demselben Blut und demselben Komplement angestellt wie der Versuch IV. Die Dosierung des Amboceptors war ebenfalls die gleiche, so daß ich dieselbe, um Wiederholungen zu vermeiden, hier nicht angebe. Der Versuch unterschied sich nur insofern, als hier der Übergang in zwei Reihen von Röhrchen vor sich ging: in physiologischer Kochsalzlösung und in 2%iger Kochsalzlösung. In Anbetracht der Identität des Salzes, welches im Prozeß des Überganges des Amboceptors und der Reaktion der Hämolyse angewendet wurde, wurde das Sediment unmittelbar nach der Bindungsreaktion und dem Abgießen der 2%igen Lösung in physiologischer Kochsalzlösung einfach aufgeschwemmt. Sonst war die Versuchsanordnung die gewöhnliche.

Sediment:

Versuch in physiol. Kochsalzlösung.	Versuch in 2%iger Kochsalzlösung.
2 l. D. fast keine neue Lösung	2 l. D. fast komplett
4 l. D. fast komplett	4 l. D. komplett
6 l. D. komplett	6 l. D. „
8 l. D. „	8 l. D. „

Abguß: 2 bis 8 l. D.: Spuren in der Kuppe.

1,0 ccm.

IX.

Versuch mit demselben Amboceptor, mit demselben Blute und Komplement wie in Versuch II. Die Dosierung war gleichfalls dieselbe. Sonst ist der Versuch mit dem vorstehenden vollständig identisch.

Sediment:

Versuch in physiol. Kochsalzlösung.	Versuch in 2%iger Kochsalzlösung.
2 l. D. fast keine neue Lösung	2 l. D. fast komplett
4 l. D. stark	4 l. D. komplett
6 l. D. wohl komplett	6 l. D. „
8 l. D. komplett	8 l. D. „

Abguß: 2 bis 8 l. D.: Spuren.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Null.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlösung: Null.

X.

Versuch mit Ziegenkaninchen-Amboceptor, dessen lösende Dosis 0,0008 ccm betrug. Die Verteilung des Amboceptors für die Bindung gestaltete sich folgendermaßen:

	Menge des 5 %-Ziegenblutes	Menge des Zgkan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlösung	Zahl der lösenden Dosen
1.	2,0 ccm	0,32 $^1/_{100}$	0,68	2 l. D.
2.	—	0,64 —	0,36	4 l. D.
3.	—	0,96 —	0,04	6 l. D.
4.	—	0,13 $^1/_{10}$	0,87	8 l. D.

Zwei Reihen solcher Röhrchen standen eine Stunde lang im Brutschrank bei 37°, worauf dieselben zentrifugiert wurden, der Abguß abgegossen, das Sediment in jedem Röhrchen der ersten Reihe in 2,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung, dasjenige in jedem Röhrchen der zweiten Reihe in 2,0 ccm einer 8,5 %igen Lösung von chemisch reinem Rohrzucker aufgeschwemmt wurde. Zu jedem Röhrchen der ersten Reihe wurden 2,0 ccm einer 5 %igen Aufschwemmung von Ziegenblut in physiologischer Kochsalzlösung, zu jedem Röhrchen der zweiten Reihe 2,0 ccm einer 5 %igen Aufschwemmung von Ziegenblut in 8,5 %iger Lösung von Rohrzucker zugefügt. Hierauf wurden sämtliche 8 Röhrchen im Wasserbad bei 40° 1 Stunde lang gehalten, dann zentrifugiert, das Sediment von der abgestandenen Flüssigkeit abgesondert und in 5,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Aus jedem Zentrifugierröhrchen wurden mittels Pipette in ein gewöhnliches Röhrchen je 2,5 ccm dieser Aufschwemmung gebracht und mit 0,2 ccm Komplement versetzt. Hierauf wurden sämtliche 8 Röhrchen für 2 Stunden in den Brutschrank, dann für 24 Stunden in den Eisschrank gebracht. Zur Kontrolle der Bindung wurde der Abguß in der üblichen Weise auf Hämolyse untersucht, wobei für diese Reaktion aus jedem Röhrchen 1,5 ccm Abguß verwendet wurden.

Sediment:

Versuch in physiol. Kochsalzlösung.	Versuch in 8,5 %iger Lösung von chemisch reinem Rohrzucker.
2 l. D. fast keine neue Lösung	2 l. D. keine neue Lösung
4 l. D. stark	4 l. D. „ „ „
6 l. D. fast komplett	6 l. D. „ „ „
8 l. D. komplett	8 l. D. kleine Aufhellung im Vergleich mit 4 und 6 l. D.

Abguß: 2 bis 4 l. D.: fast Null,
6 bis 8 l. D.: Spuren.

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: fast Null.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlösung: Null.

XI.

Zum Unterschied von den vorgehenden Experimenten wurde die primäre Bindung des Amboceptors nicht mittels Ziegenblut, sondern mit-

tels Rinderblut, der Übergang jedoch wie gewöhnlich auf Ziegenblut bewerkstelligt. Die lösende Dosis für Rinderblut betrug 0,006 ccm. Die Verteilung des Amboceptors und die Wahl der lösenden Dosen gestaltete sich folgendermaßen:

	Menge des 5%-Rinderblutes	Menge des Zgkan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlösung	Zahl der lösenden Dosen
1.	3,0 ccm	0,36 1/10	2,64	2 l. D.
2.	—	0,54 —	2,46	3 l. D.
3.	—	0,72 —	2,28	4 l. D.
4.	—	0,90 —	2,10	5 l. D.
5.	—	1,08 —	1,92	6 l. D.
6.	—	1,26 —	1,74	7 l. D.
7.	—	1,44 —	1,56	8 l. D.
8.	—	1,62 —	1,38	9 l. D.

Diese Reihe Zentrifugierröhrchen wurde nach der einstündigen Bindung des Amboceptors im Brutschrank zentrifugiert, das Sediment zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und darauf in jedem Röhrchen in 6,0 ccm derselben Lösung aufgeschwemmt. Aus jedem Röhrchen wurden zweimal je 2,0 ccm dieser Aufschwemmung in zwei Röhrchenreihen: in gewöhnliche und in Zentrifugenröhrchen übertragen. Zu jedem Röhrchen der 1. Reihe wurde 1 ccm einer 5%igen Aufschwemmung von Ziegenblut in physiologischer Kochsalzlösung zugefügt, worauf die Röhrchen für 1 Stunde im Wasserbade bei 40° gehalten wurden. Die Röhrchen der 2. Reihe wurden zentrifugiert und die Kochsalzlösung in denselben durch 8,5%ige Lösung von Rohrzucker ersetzt; zu dieser Reihe wurde das Ziegenblut in 8,5%iger Rohrzuckerlösung hinzugesetzt, worauf auch diese Röhrchen im Wasserbade bei derselben Temperatur gehalten wurden. Nach einstündigem Stehen im Wasserbade wurden in jedes Röhrchen der 1. Reihe 0,2 ccm Komplement hinzugefügt und die Röhrchen für 2 Stunden in den Brutschrank, dann für 24 Stunden in den Eisschrank gestellt. In den Röhrchen der 2. Reihe wurde die Zuckerlösung zuvor durch Kochsalz ersetzt, und dann erst die Prüfung auf die Hämolysereaktion vorgenommen. Der Abguß wurde auf Hämolyse mit Rinderblut geprüft. Die Qualität des Komplements wurde sowohl mit Rinder- wie auch mit Ziegenblut geprüft.

Sediment:

Versuch in physiol. Kochsalzlösung.	Versuch in 8,5%iger Lösung von chemisch reinem Rohrzucker.
2 l. D. stark (noch deutlicher Niederschlag)	2 l. D. keine neue Lösung
3 l. D. fast komplett	3 l. D. „ „ „
4 l. D. komplett	4 l. D. „ „ „
5 l. D. „	5 l. D. „ „ „
6 l. D. „	6 l. D. „ „ „
7 l. D. „	7 l. D. „ „ „

8 l. D. komplett	8 l. D. Sediment vielleicht etwas geringer
9 l. D. „	9 l. D. Sediment vielleicht etwas geringer

Abguß: 2 bis 7 l. D.: fast Null,
7 bis 9 l. D.: Spuren.

1,0 ccm Rinderblut + 0,1 ccm Komplement: Spuren.
1,0 ccm Rinderblut + 0,1 ccm Kochsalzlösung: Null.
1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: Spuren.
1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Kochsalzlösung: fast Null.

In Anbetracht des Umstandes, daß die Versuchsanordnung mehrfaches Waschen des Blutes in verschiedenen Lösungen erheischte, welche Manipulationen die Widerstandsfähigkeit der roten Blutkörperchen in bezug auf die Hämolyse etwa beeinflussen und dadurch die Versuchsergebnisse entstellen konnten, habe ich eine Reihe Kontrollversuche in dieser Richtung angestellt. Dieselben zerfallen in zwei Abteilungen. In der ersten suchte ich festzustellen, inwiefern die roten Blutkörperchen hinsichtlich ihrer Widerstandsfähigkeit der Hämolyse gegenüber eine Änderung erfahren, wenn sie nacheinander in verschiedenen Medien gewaschen werden, und zwar im Vergleich zu den roten Blutkörperchen, die einfach in Kochsalzlösung aufgeschwemmt werden. Durch die zweite Versuchsreihe suchte ich zu eruieren, inwiefern dieselben Verhältnisse auf die roten Blutkörperchen wirken, die mit dem Amboceptor bereits in Bindung sind.

XII.

Um festzustellen, ob die Widerstandsfähigkeit der roten Blutkörperchen der Hämolyse gegenüber nicht durch Waschen derselben in isotonischen Lösungen verschiedener Salze, bzw. in hypertonischer Kochsalzlösung mit nachfolgendem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung beeinflußt wird, wurde der Ziegenkaninchen-Amboceptor auf 1,0 ccm Ziegenblut eingestellt. Unter A sind die Resultate der Hämolyse mit bis zu 5% mittels physiologischer Kochsalzlösung verdünntem und nach 1 Stunde zweimal in derselben Lösung gewaschenem Blute, unter B die Resultate der Hämolyse mit bis zu 5% mittels 1.1%iger Lösung von KCl verdünntem und nach 1 Stunde mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenem und wiederum in derselben Lösung aufgeschwemmtem Blute, unter C die Resultate der Hämolyse mit bis 5% mittels 1,62%iger Lösung von $CaCl_2$ verdünntem und im weiteren in gleicher Weise wie vorher bearbeitetem Blute, unter D die Resultate der Hämolyse mit bis 5% mittels 2%iger Kochsalzlösung verdünntem und dann nach 1 Stunde in physiologischer Kochsalzlösung gewaschenem und aufgeschwemmtem Blute angegeben.

Menge des Zgkan.-Amboc.	Menge der Kochsalzlösung	Menge des Ziegenblutes	A	B	C	D
0,6 $^{1}/_{10}$	0,4	1,0	komplett	komplett	komplett	komplett
0,4 —	0,6	—				
0,2 —	0,8	—	f.kompl., Niederschlag sehr klein	f.kompl., Niederschlag sehr klein	wohl komplett	wohl komplett
0,1 —	0,9	—			f.kompl., Niederschlag sehr klein	f.kompl., Niederschlag sehr klein
0,8 $^{1}/_{1000}$	0,2	—				
0,6 —	0,4	—	f. kompl.			
0,4 —	0,6	—	stark	stark	stark	stark
0,2 —	0,8	—				
0	1,0	—	Null	Spuren	Spürchen	Null
0	1,1	—	Null	fast Null	Null	Null

XIII.

Der Versuch ist die Fortsetzung des vorigen. Aus diesem geht hervor, welchen Einfluß auf den Gang der Reaktion der Hämolyse das Waschen des Blutes in 8,5%iger Rohrzuckerlösung und das Vorhandensein einer geringen Quantität derselben Lösung bei der Ausführung dieser Reaktion haben. Der Versuch bestand wie im vorstehenden Falle in Eintellung des Ziegenkaninchen-Amboceptors auf Ziegenblut. Unter A sind die Resultate der Hämolyse mit bis zu 5% in physiologischer Kochsalzlösung verdünntem, nach 1 Stunde gewaschenem und dann in derselben Lösung aufgeschwemmtem Blute, unter B die Resultate der Hämolyse mit in 8,5%iger Rohrzuckerlösung verdünntem, nach 1 Stunde in physiologischer Kochsalzlösung gewaschenem und dann in derselben Lösung aufgeschwemmtem Blute, unter C die Resultate der Hämolyse mit in Zuckerlösung verdünntem und nach Zentrifugierung in Kochsalzlösung aufgeschwemmtem Blute angegeben.

Menge des Zgkan.-Amboc.	Menge der Kochsalzlösung	Menge des Ziegenblutes	A	B	C
0,9 $^{1}/_{1000}$	0,1	1,0	komplett	komplett	komplett
0,8 —	0,2	—			
0,7 —	0,3	—	wohl kompl.		
0,3 —	0,7	—	fast komplett	fast komplett	fast komplett
0,1 —	0,9	—	stark	stark	stark
0,5 $^{1}/_{10\,000}$	0,5	—	mäßig	mäßig	mäßig
0	1,0	—	Spürchen	Spürchen	Spürchen
0	1,1	—	Null	Null	Null

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluß des Waschens der mit Amboceptor versehenen roten Blutkörperchen in Lösungen von verschiedenen Substanzen studiert. Die Methodik gestaltete sich im Gegensatz zu derjenigen der vorangegangenen Untersuchungen folgendermaßen: 2,0 ccm Blut (5%ige Verdünnung, zweimal gewaschen) wurde mit einer ganzen Reihe lösender Amboceptordosen, mit 1 oder 2 Dosen beginnend und allmählich bis zu Bruchteilen einer Dosis hinuntersteigend, gebunden. Nach Beendigung der Bindung (1 Stunde, 37°) wurde die Reihe der Röhrchen (die Bindung wurde in zwei Reihen von Röhrchen bewerkstelligt) zentrifugiert und der Niederschlag in jedem Röhrchen in 3,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. In den Röhrchen der zweiten Reihe wurde das Sediment nach der Zentrifugierung in 3,0 ccm irgendeiner Lösung, welche früher bei den Experimenten verwendet wurde, aufgeschwemmt. Nach 1 Stunde wurden sämtliche Röhrchen zentrifugiert, das Sediment gewaschen und dann in physiologischer Kochsalzlösung (3,0 ccm) aufgeschwemmt. Aus jedem Zentrifugier-Röhrchen wurden in ein entsprechendes einfaches Röhrchen 1,5 ccm übertragen. Außerdem wurde in jedes Röhrchen 0,1 ccm Komplement hinzugesetzt, worauf sämtliche einfachen Röhrchen für 2 Stunden in den Brutschrank und dann für 24 Stunden in den Eisschrank gebracht wurden.

XIV.

In 8 Zentrifugier-Röhrchen wurden entsprechend verteilt:

	Menge des 5%-Ziegenblutes	Menge des Zgkan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlösung	Zahl der lösenden Dosen	
1.	2,0 ccm	0,18 1/100	0,82	1 l. D.	Die
2.	—	0,15 —	0,85	5/6 l. D.	lösende
3.	—	0,14 —	0,86	3/4 l. D.	Dosis
4.	—	0,12 —	0,88	2/3 l. D.	betrug
5.	—	0,90 1/1000	0,10	1/2 l. D.	0,0009 ccm
6.	—	0,60 —	0,40	1/3 l. D.	
7.	—	0,45 —	0,55	1/4 l. D.	
8.	—	0,30 —	0,70	1/6 l. D.	

Nach der Bindung des Amboceptors und Zentrifugieren wurde das Sediment der einen Reihe von Röhrchen in 3,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung, das Sediment in der zweiten Röhrchenreihe in 3,0 ccm einer 1,62%igen Lösung von $CaCl_2$ aufgeschwemmt. Nach 1stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurden die Reagensgläschen zentrifugiert, das Sediment gewaschen und dann in 3,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Im weiteren Verlaufe wurde die Bearbeitung wie oben angegeben bewerkstelligt.

Sediment:

Versuch in physiol. Kochsalzlösung.	Versuch in Lösung von $CaCl_2$ (1,62%).
1 l. D. komplett	1 l. D. komplett
5/6 l. D. wohl komplett	5/6 l. D. wohl komplett
3/4 l. D. sehr kleine Trübung	3/4 l. D. fast komplett

$^2/_3$ l. D. fast komplett	$^2/_3$ l. D. fast komplett
$^1/_2$ l. D. stark	$^1/_2$ l. D. stark
$^1/_3$ l. D. mäßig	$^1/_3$ l. D. mäßig
$^1/_4$ l. D. „	$^1/_4$ l. D. „
$^1/_6$ l. D. „	$^1/_6$ l. D. „

Abguß: 1 bis $^1/_6$ l. D.: fast Null.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Null.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlösung: Null.

XV.

Der Versuch war dem vorstehenden vollständig analog, wies nur den Unterschied auf, daß das Waschen des mit Amboceptor beladenen Blutes in der zweiten Röhrchenreihe in 2%iger Kochsalzlösung bewerkstelligt wurde.

Sediment:

Versuch in physiol. Kochsalzlösung.	Versuch in 2%iger NaCl-Lösung
1 l. D. fast komplett[1])	1 l. D. fast komplett
$^5/_6$ l. D. stark	$^5/_6$ l. D. „ „
$^3/_4$ l. D. „	$^3/_4$ l. D. stark
$^2/_3$ l. D. „	$^2/_3$ l. D. „
$^1/_2$ l. D. mäßig	$^1/_2$ l. D. „
$^1/_3$ l. D. „	$^1/_3$ l. D. mäßig
$^1/_4$ l. D. „	$^1/_4$ l. D. „
$^1/_6$ l. D. wenig	$^1/_6$ l. D. wenig

Abguß: 1 bis $^1/_6$ l. D.: fast Null.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Komplement: Spuren.
1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kochsalzlösung: Null.

XVI.

Versuch mit ungefähr denselben Amboceptordosen, jedoch mit anderem Ziegenkaninchen-Amboceptor, dessen lösende Dosis 0,0008 ccm betrug. Die Verteilung des Amboceptors gestaltete sich folgendermaßen:

	Menge des 5%-Ziegenblutes	Menge des Zgkan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlösung	Zahl der lösenden Dosen
1.	2,0 ccm	0,32 $^1/_{100}$	0,68	ungefähr 2 l. D.
2.	—	0,16 —	0,84	„ 1 l. D.
3.	—	0,12 —	0,88	„ $^3/_4$ l. D.
4.	—	0,10 —	0,90	„ $^2/_3$ l. D.
5.	—	0,80 $^1/_{1000}$	0,20	„ $^1/_2$ l. D.

Im Gegensatz zu den vorstehenden Experimenten wurde hier in der zweiten Röhrchenreihe die Waschung des Blutes nach der Bindung desselben mit dem Amboceptor in 8,5%iger Lösung von Rohrzucker bewerkstelligt.

---

[1]) Die Abschwächung des Grades der Hämolyse, die sich bei diesem Experiment im Vergleich zum XIV. Experiment bemerkbar machte, läßt sich durch die Verringerung der Wirksamkeit des Komplements erklären.

Sediment:

Versuch in physiol. Kochsalzlösung.			Versuch in 8,5%iger Rohrzuckerlösung.		
2 l. D.	(ungefähr)	komplett	2 l. D.	(ungefähr)	komplett
1 l. D.	„	„	2 l. D.	„	„
3/4 l. D.	„	wohl komplett	3/4 l. D.	„	„
2/3 l. D.	„	fast komplett	2/3 l. D.	„	fast komplett
1/2 l. D.	„	„ „	1/2 l. D.	„	„ „

Abguß: 2 bis 1/2 l. D.: fast Null.

Wenn man die Resultate der Kontrollversuche betrachtet, so kann man mit absoluter Klarheit sehen, daß mit Ausnahme geringfügiger Schwankungen, die in den Grenzen eines Versuchsfehlers liegen, der Grad der Lösung der roten Blutkörperchen bei ein und derselben Amboceptordosis vollkommen gleich bleibt, gleichviel ob wir die Blutkörperchen dreimal in physiologischer Kochsalzlösung oder einmal in irgendeiner anderen Lösung (von den bei den Grundexperimenten verwendeten Lösungen) und dann zweimal in physiologischer Kochsalzlösung wuschen. Diese Regel bleibt in Kraft, ob die roten Blutkörperchen in diesen Lösungen vor oder nach der Bindung des Amboceptors gewaschen werden.

Auf diese Weise wird die Eventualität einer Annahme, daß die Resultate der Grundexperimente in irgendeinem Zusammenhang mit Nebenumständen stehen, vollkommen beseitigt. Man kann mit Sicherheit sagen, daß die von uns beobachteten Veränderungen im Grade der Lösung der roten Blutkörperchen nicht die Folge ihrer abgeschwächten Widerstandsfähigkeit der Hämolyse gegenüber, sondern die Folge derjenigen Veränderungen im Verlaufe der in Rede stehenden Reaktion sind, die in derselben unter dem Einflusse der Veränderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Mediums eintraten. Es muß darauf hingewiesen werden, daß der Unterschied zwischen dem Grade des Übergangs des Amboceptors auf die neu zugesetzten roten Blutkörperchen am wenigsten zwischen zwei Natriumsalzen bemerbar war: dem Chlor- und Bromsalz. Dieser Unterschied übertrifft im Experiment III nicht die Höhe einer einzigen lösenden Dosis; im Experiment IV ist derselbe noch geringer. Einen ganz anderen Eindruck gewinnt man, wenn man die Resultate des Übergangs des Amboceptors in den Chlorsalzen des Natriums, Kaliums und Calciums miteinander ver-

gleicht. Während in physiologischer Kochsalzlösung der vollständige Übergang einer lösenden Amboceptordosis im Durchschnitt bei sechs ursprünglich gebundenen Dosen vor sich geht, vollzieht sich dieser Übergang in einer isotonischen Lösung von Chlor-Kalium und Chlor-Calcium in weiteren Dimensionen: in Chlor-Kaliumlösung wurde er in der Mehrzahl der Fälle schon bei zwei lösenden Dosen, in Chlor-Calciumlösung ungefähr bei drei lösenden Dosen beobachtet. Die Experimente mit Brom- und Jod-Kalium waren nicht zahlreich genug, um aus denselben bestimmte Schlüsse ziehen zu dürfen; wenn aber in der Wirkung der verschiedenen Haloidsalze ein Unterschied besteht, so ist derselbe augenscheinlich geringfügig. Man kann natürlich nicht umhin, die Tatsache anzuerkennen, daß unsere Methodik für solche Experimente nicht präzise genug war; die Wahl von 2, 4, 6, 8 lösenden Dosen war für diejenigen Schwankungen, die sich in der Sphäre von 2 bis 4 lösenden Dosen vollzogen, nicht ganz geeignet. Eine Entschuldigung ist hier die Tatsache, daß wir zur Gewinnung mehr oder minder wertvoller Resultate gezwungen waren, stets Parallelexperimente mit physiologischer Kochsalzlösung anzustellen, in der der vollständige Übergang der lösenden Amboceptordosis erst bei sechs lösenden Dosen eintritt. Die Zahl der Röhrchen behufs Erreichung feinerer Gradationen zu vergrößern, gestatteten nicht die Verhältnisse des Experiments, welches wegen seiner Kompliziertheit samt der Einstellung des Amboceptors bisweilen mehr als zwei Tage erforderte. Trotz der geringen Genauigkeit der von uns angewendeten Methode, die nicht die Möglichkeit gewährt, eine feine Differenz zwischen der Wirkung der einzelnen Salze ein und desselben Metalls durchzuführen, können wir auf Grund unserer Experimente doch ganz bestimmt feststellen, daß die Natriumsalze im Vergleich zu den isotonischen Kalium- und Calciumsalzen augenscheinlich ein Medium sind, welches die Abspaltung des einmal bereits gebundenen Amboceptors am wenigsten begünstigt. Diese Erscheinung gewinnt besondere Bedeutung vom Standpunkte der Resultate der letzten Versuche. Wenn wir die Salzkonzentration des Mediums durch Anwendung einer $2^{0}/_{0}$igen Kochsalzlösung steigern, so sehen wir, daß in der hypertonischen Kochsalzlösung der Übergang des Amboceptors in weiteren Dimensionen vor sich geht als in physiologi-

scher Kochsalzlösung. Vollständiger Übergang einer lösenden Dosis wird augenscheinlich bereits bei drei lösenden Dosen beobachtet. Eine vollständig entgegengesetzte Erscheinung trat ein, als wir die Salzlösung durch eine Rohrzuckerlösung ersetzten, welche der Kochsalzlösung isotonisch war (8,5%). In diesem Falle ist eine bemerkbare Abspaltung des Amboceptors überhaupt nicht eingetreten. Das Sediment, welches von den ungelösten roten Blutkörperchen zurückblieb, war dem Sediment von 1,0 ccm 5%iger Blutaufschwemmung vollständig gleich. Die unbedeutende Verringerung des Sediments, welche bei acht und neun lösenden Dosen beobachtet wurde, muß augenscheinlich auf die Wirkung derjenigen geringen Salzspuren zurückgeführt werden, die vom Sediment nach der Zentrifugierung vor der Aufschwemmung desselben in Rohrzuckerlösung festgehalten worden sind (cf. Experiment X). Man muß also annehmen, daß die Lösung, welche Salze nicht enthält, die Abspaltung des Amboceptors vollständig behindert, und diese desto energischer vor sich geht, je höher die Salzkonzentration ist. (Die Abspaltung des Amboceptors in 2%iger Kochsalzlösung geht energischer vor sich als in 0,85%iger Lösung, und in dieser letzteren energischer als in einer 8,5%igen Rohrzuckerlösung.) Aus den Experimenten mit isotonischen Lösungen verschiedener Salze geht hervor, daß nicht alle Ionen im Sinne ihres Einflusses auf den Umfang der Abspaltung des gebundenen Amboceptors gleichbedeutend sind. Augenscheinlich besitzen die Ionen der Natronsalze eine geringere Fähigkeit, diese Abspaltung zu beeinflussen, als die Ionen der Kalium- und Calciumsalze.

III.

v. Dungern (4) hat im Jahre 1900 nachgewiesen, daß die Immunisierung von Kaninchen mit Flimmerepithelzellen aus der Trachea des Rindes die Bildung von Antikörpern bewirkt, die nicht nur auf das Flimmerepithel wirken, sondern auch die roten Blutkörperchen des Rindes lösen. Die Injektion von Kuhmilch bewirkt bei Kaninchen die Bildung vom Hämolysinen, die für das Rinderblut spezifisch sind. Diese

Beobachtungen sind neuerdings von H. Ludke (9) bestätigt worden, der außerdem die Bildung von Hämolysinen dadurch bewirkte, daß er Tieren Emulsionen aus der Glandula thyreoidea und aus dem Ovarium injizierte. Ähnliche Tatsachen haben Ehrlich und Morgenroth (5) zu der Überzeugung gebracht, daß die Immunkörper komplizierte Substanzen seien, daß deren Spezifizität nicht in morphologischem, sondern in receptorischem Sinne aufgefaßt werden müsse, d. h. daß jedes Antigen, welches eine gewisse receptorische Formel besitzt, die Bildung von so verschiedenen Antikörpern zu bewirken vermag, wieviel verschiedene receptorische Gruppen dasselbe enthält. Da nun einige receptorische Gruppen in der Tierwelt außerordentlich verbreitet sind, so können auch die unter dem Einfluß verschiedener Antigene gewonnenen Antikörper gleiche spezielle Eigenschaften besitzen. Dieses Gesetz bleibt nicht nur in Bezug auf Antikörper, deren Bildung durch verschiedene Antigene bei ein und demselben Tiere hervorgerufen wird, in Kraft, sondern auch in bezug auf Antikörper, welche durch ein und dasselbe Antigen bei verschiedenen Tieren hervorgerufen werden. In der 6. Mitteilung über Hämolysine haben Ehrlich und Morgenroth (3) nachgewiesen, daß der hämolytische Amboceptor bei einem Kaninchen durch Injektion von Rinderblut erzeugt, nicht nur auf Rinderblut, sondern auch auf Ziegenblut hämolytisch wirkt, wobei für das Ziegenblut die einzelne lösende Dosis dieses Amboceptors bedeutend größer ist als diejenige für Rinderblut. Vollkommen analoge Beziehungen sind zwischen Ziegen-Kaninchen-Amboceptor und Rinderblut wahrgenommen worden. Es hat sich dabei herausgestellt, daß das Rinderblut bei der Bindung von Rinder-Kaninchen-Serum den ganzen Amboceptor wegnimmt, während das Ziegenblut nur einen Teil desselben an sich zieht. Der mit dem Ziegenblut nicht in Verbindung getretene Teil des Amboceptors wird vom Rinderblut gut gebunden, wobei er diesem letzteren gegenüber häufig ebenso starke hämolytische Eigenschaften bekundet wie ein ganzer Amboceptor. Die Autoren haben auf Grund dieser Tatsachen ein Schema konstruiert, nach dem das Rinderblut gleichsam Träger einer ganzen Reihe von Receptoren a und einer anderen Reihe von Receptoren β ist, während das Ziegen-

blut Träger der Receptoren β, die mit denjenigen des Rinderblutes identisch sind, und seiner spezifischen Receptoren γ ist. Dementsprechend besteht der beim Kaninchen durch Injektion von Rinderblut erzeugte Immunkörper aus zwei Amboceptoren: die cytophile und haptophore Gruppe des einen dieser Amboceptoren entspricht dem Receptor α, diejenige des anderen Amboceptors entspricht dem Receptor β. Der Immunkörper, der das Resultat der Ziegenblutinjektion ist, besteht aus zwei anderen Amboceptoren: β und γ.

Trotzdem sämtliche oben mitgeteilten Tatsachen ein beredtes Zeugnis dafür ablegen, daß dieses Schema der Wirklichkeit entspricht, sind neue Beweise zugunsten ihrer Realität meines Wissens bis jetzt nicht vorhanden. Bis auf den heutigen Tag ist es mit Bestimmtheit nicht erwiesen, daß die Receptoren von Ziegen- und Rinderblut des Typus β miteinander vollständig identisch sind, daß der Immunkörper, der den Receptoren des Typus β des Ziegenblutes entspricht, mit demjenigen Immunkörper vollkommen identisch ist, der seine Bildung der Gruppe β des Rinderblutes verdankt. Und doch ist die Reaktion des Überganges des gebundenen Amboceptors auf das neu hinzugesetzte Blut eine außerordentlich bequeme Methode, mit der man in der angegebenen Richtung Untersuchungen anstellen kann. Denn, kennen wir einmal die Gesetze des Übergangs des Ziegen-Kaninchen-Amboceptors vom Ziegenblut auf Ziegenblut, so können wir aus den Beobachtungen über denselben Prozeß nach Ersatz einiger Elemente durch andere diesen nahestehende interessante Schlüsse über ihre Wechselbeziehungen ziehen. Indem wir Ziegenblut mit Rinder-Kaninchen-Amboceptor verbinden, schließen wir gleichsam aus der Gesamtmasse des Rinder-Kaninchen-Amboceptors nur den oben erwähnten Teil desselben β aus, und wenn wir nun die Gesetze des Übergangs dieses Teiles β von Ziegenblut auf Ziegenblut und Rinderblut studieren, so können wir über die Wechselbeziehung der entsprechenden Receptorengruppen des Ziegen- und Rinderblutes urteilen. Zu demselben Ziele führt das Studium des Übergangs des mit Rinderblut gebundenen Ziegen-Kaninchen-Amboceptors auf Rinder- und Ziegenblut. Die Gegenüberstellung dieser beiden Parallelexperimente kann uns über die

Identizität oder die Verschiedenheit der isolierten Kreuzbindungen der allgemeinen Teile der Ziegen-Kaninchen- und Rinder-Kaninchen-Amboceptoren usw. belehren. Der Bearbeitung dieser Fragen ist der dritte Teil meiner Arbeit gewidmet.

Bevor ich die Versuche selbst und deren Resultate beschreibe, möchte ich zunächst einige technische Punkte der Arbeit beleuchten. Für meine Untersuchungen verwendete ich zwei Reihen hämolytischer Amboceptoren, die bei Kaninchen durch Injektion von defibriniertem Ziegen- resp. Rinderblut erzeugt worden sind. Die Injektion fand gewöhnlich zweimal statt: zunächst wurden 5 ccm ganzen defibrinierten Blutes in die Ohrvene, dann 7 Tage nach der ersten Injektion 10 ccm desselben Blutes intraperitoneal injiziert. 7 bis 10 Tage nach der zweiten Injektion wurde das Serum des Kaninchens in der im ersten Teil der Arbeit beschriebenen Weise gesammelt und in der oben gleichfalls beschriebenen Weise inaktiviert. Als Komplement diente bei allen Experimenten frisches Serum von Meerschweinchen mit der Berechnung, daß 0,1 ccm auf 1 ccm Ziegen- oder Rinderblut kam. Der Übergang des Amboceptors wurde in allen Versuchen ohne Ausnahme innerhalb 1 Stunde im Wasserbade bei 40° bewerkstelligt.

Die einzelne lösende Dosis für jeden Amboceptor wurde vor jedem Experiment mit Ziegenblut, Rinderblut und Komplement von demselben Datum wie beim Experiment selbst festgestellt.

Die Untersuchungen zerfallen in zwei Abteilungen. In der ersten Reihe von Experimenten schloß ich, indem ich den Rinder-Kaninchen-Amboceptor mit Ziegenblut und den Ziegen-Kaninchen-Amboceptor mit Rinderblut verband, den allgemeinen Teil des Immunkörpers aus und studierte die Gesetze seines Übergangs auf die eine oder die andere Blutart. In der zweiten Reihe wurde die Bindung des einen oder des anderen Amboceptors durch das entsprechende Blut bewerkstelligt, während der Übergang sowohl auf Rinder- wie auch auf Ziegenblut bewerkstelligt wurde.

I.

Versuch mit Ziegen-Kaninchen-Amboceptor, dessen lösende Dosis für das Ziegenblut 0,0008 ccm, für Rinderblut 0,01 ccm ergab:

	Menge des 5%-Rinderblutes	Menge des Ziegen-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl der lös. Dosen für Rinderblut
1.	2 ccm	0,20 $^1/_{10}$	0,80	1 l. D.
2.	—	0,40 —	0,60	2 l. D.
3.	—	0,60 —	0,40	3 l. D.
4.	—	0,80 —	0,20	4 l. D.
5.	—	0,10 unverd.	0,90	5 l. D.
6.	—	0,12 —	0,88	6 l. D.
7.	—	0,14 —	0,86	7 l. D.
8.	—	0,16 —	0,84	8 l. D.
9.	—	0,18 —	0,82	9 l. D.

Zwei Reihen solcher Röhrchen verbleiben im Brutschrank 1 Stunde lang bei 37°, worauf dieselben zentrifugiert werden, das Sediment einmal gewaschen und dann in 3,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt wird. Aus jedem Zentrifugierröhrchen werden 1,5 ccm in ein Röhrchen gebracht, worauf zu den Röhrchen der ersten Reihe je 1,0 ccm einer 5%igen Aufschwemmung von zweimal gewaschenem Ziegenblut, zu jedem Röhrchen der zweiten Reihe 1,0 ccm einer gleichen Rinderblut-Aufschwemmung hinzugegeben werden. Weitere Versuchanordnung: Stehen im Wasserbade, Zusatz von Komplement usw., genau wie bei den früheren Experimenten.

Sediment:

A. Übergang von Ziegen-Kaninchen-Amboceptor von Rinderblut auf Ziegenblut.	B. Übergang von Ziegen-Kaninchen-Amboceptor von Rinderblut auf Rinderblut.
1 l. D. stark	1 l. D. keine neue Lösung
2 l. D. Sediment kleiner	2 l. D. Sediment kleiner
3 l. D. f. komplett	3 l. D. noch kleiner
4 l. D. komplett	4 l. D. stark
5 l. D. „	5 l. D. fast komplett
6 l. D. „	6 l. D. „ „
7 l. D. „	7 l. D. „ „
8 l. D. „	8 l. D. komplett
9 l. D. „	9 l. D. „

Abguß:

1 l. D. 1,5 ccm v. Abguß + 1,0 ccm Rdbl. + 0,1 ccm Kompl.: Spuren
2 l. D. 1,5 „ „ „ + 1,0 „ „ + 0,1 „ „ wenig
3 l. D. 1,5 „ „ „ + 1,0 „ „ + 0,1 „ „ mäßig
4—9 l. D. 1,5 „ „ „ + 1,0 „ „ + 0,1 „ „ stark

1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kompl.: wenig; 1,0 ccm Rdbl. + 0,1 ccm Kompl.: wenig.
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlsg.: Null; 1,0 ccm Rdbl. + 0,1 ccm Kochsalzlsg.: Null

II.

Der Versuch ist dem ersten analog. Die letzte Feststellung ergab für Ziegenblut als einzelne lösende Dosis 0,0005 ccm, für Rinderblut 0,0075 ccm.

	Menge des 5 %-Rinderblutes	Menge des Ziegen-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl d. lös. Dosen für Rinderblut
1.	2,0 ccm	0,30 1/10	0,70	2 l. D.
2.	—	0,45 —	0,55	3 l. D.
3.	—	0,60 —	0,40	4 l. D.
4.	—	0,75 —	0,25	5 l. D.
5.	—	0,90 —	0,10	6 l. D.
6.	—	0,11 unverd.	0,89	7 l. D.
7.	—	0,12 —	0,88	8 l. D.
8.	—	0,15 —	0,85	10 l. D.
9.	—	0,17 —	0,83	11 l. D.

Bindung und Übergang sowie Reaktion auf Hämolyse werden nach den allgemeinen Regeln bewerkstelligt.

Sediment:

A. Übergang von Ziegen-Kaninchen-Amboceptor von Rinderblut auf Ziegenblut.	B. Übergang von Ziegen-Kaninchen-Amboceptor von Rinderblut auf Rinderblut.
2 l. D. f. komplett	2 l. D. noch großer Niederschlag
3 l. D. komplett	3 l. D. „ „ „
4 l. D. „	4 l. D. stark. Sediment klein
5 l. D. „	5 l. D. fast komplett
6 l. D. „	6 l. D. komplett
7 l. D. „	7 l. D. „
8 l. D. „	8 l. D. „
10 l. D. „	10 l. D. „
11 l. D. „	11 l. D. „

Abguß:

2—5 l. D.	1,5 ccm Abguß	+ 1,0 ccm Rdbl.	+ 0,1 ccm Kompl.:		Null
6—8 l. D.	1,5 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „	„	wenig
9 l. D.	1,5 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „	„	mäßig
10 l. D.	1,5 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „	„	f. komplett
11 l. D.	1,5 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „	„	komplett

1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: f. Null
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null
1,0 „ Rinderblut + 0,1 „ Komplement: Spürchen
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null

III.

Der Versuch wurde mit Ziegen-Kaninchen-Amboceptor, dessen lösende Dosis für Ziegenblut 0,008 ccm, für Rinderblut 0,006 ccm betrug, angestellt. Der Versuch unterschied sich von dem vorangehenden da-

durch, daß die Bindung nur in der einen Zentrifugierröhrchenreihe mit 3,0 ccm Rinderblut in einem Flüssigkeitsvolumen von 6,0 ccm (Amboceptor und physiologische Kochsalzlösung mitgerechnet) bewerkstelligt wurde. Nach der Bindung des Amboceptors wurde das Sediment gewaschen, dann in 6,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung in jedem Röhrchen aufgeschwemmt. Aus jedem Zentrifugierröhrchen wurden zweimal je 2,0 ccm in zwei Reihen gewöhnlicher Reagensgläschen übertragen. Im weiteren Verlauf war die Versuchsanordnung mit derjenigen der vorhergehenden Experimente identisch. Die Dosierung und das Verhalten des Amboceptors gestalteten sich folgendermaßen:

	Menge des 5%-Rinder-blutes	Menge des Ziegen-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl d. lös. Dosen für Rinderblut
1.	3,0 ccm	0,36 1/10	2,64	2 l. D.
2.	—	0,54 —	2,46	3 l. D.
3.	—	0,72 —	2,28	4 l. D.
4.	—	0,90 —	2,10	5 l. D.
5.	—	1,08 —	1,92	6 l. D.
6.	—	1,26 —	1,74	7 l. D.
7.	—	1,44 —	1,56	8 l. D
8.	—	1,62 —	1,38	9 l. D.

Die erzielten Resultate waren:

Sediment:

A. Übergang von Ziegen-Kaninchen-Amboceptor von Rinderblut auf Ziegenblut.	B. Übergang von Ziegen-Kaninchen-Amboceptor von Rinderblut auf Rinderblut.
2. l. D. stark	2 l. D. stark (Sediment bedeut. größer w. a. Ziegenblut)
3 l. D. f. komplett	3 l. D. (Sediment kleiner)
4 l. D. komplett	4 l. D. (Sediment noch kleiner)
5 l. D. „	5 l. D. f. komplett
6 l. D. „	6 l. D. komplett
7 l. D. „	7 l. D. „
8 l. D. „	8 l. D. „
9 l. D. „	9 l. D. „

Abguß:

2—7 l. D. 2,0 ccm Abguß + 1,0 ccm Rdbl. + 0,1 ccm Kompl.: f. Null
8—9 l. D. 2,0 „ „ + 1,0 „ „ + 0,1 „ „ Spuren
1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: Spuren
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: fast Null
1,0 „ Rinderblut + 0,1 „ Komplement: Spuren
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null

IV.

Versuch mit Übergang von mit Ziegenblut gebundenem Rinder-Kaninchen-Amboceptor auf Rinderblut und Ziegenblut. Die einzelne lösende Dosis dieses Amboceptors betrug für Rinderblut 0,006 ccm, für Ziegenblut 0,014 ccm.

	Menge des 5 %-Ziegenblutes	Menge des Rinder-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl der lös. Dosen für Ziegenblut
1.	3,0 ccm	0,84 1/10	2,16	2 l. D.
2.	—	1,26 —	1,74	3 l. D.
3.	—	1,68 —	1,32	4 l. D.
4.	—	2,10 —	0,90	5 l. D.
5.	—	2,52 —	0,48	6 l. D.
6.	—	2,94 —	0,06	7 l. D.
7.	—	0,34 unverd.	2,66	8 l. D.
8.	—	0,38 —	2,62	9 l. D.

Die Versuchsanordnung war im weiteren mit derjenigen von Nr. 3 vollkommen identisch.

Sediment:

A.

Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Ziegenblut auf Rinderblut.

2 l. D. stark (Sediment klein)
3 l. D. f. komplett
4 l. D. komplett
5 l. D. „
6 l. D. „
7 l. D. „
8 l. D. „
9 l. D. „

B.

Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Ziegenblut auf Ziegenblut.

2 l. D. stark (Sediment kleiner wie auf Rinderblut)
3 l. D. f. komplett
4 l. D. komplett
5 l. D. „
6 l. D. „
7 l. D. „
8 l. D. „
9 l. D. „

Abguß:

2 l. D. 2,0 ccm Abguß + 1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kompl.: wenig
3 l. D. 2,0 „ „ + 1,0 „ „ + 0,1 „ „ mäßig
4—6 l. D. 2,0 „ „ + 1,0 „ „ + 0,1 „ „ f. komplett
7—9 l. D. 2,0 „ „ + 1,0 „ „ + 0,1 „ „ komplett
1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: fast Null
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null
1,0 „ Rinderblut + 0,1 „ Komplement: Spuren
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null

V.

Versuch mit demselben Amboceptor wie im vorstehenden Experiment. Die lösende Dosis dieses Amboceptors betrug für Ziegenblut 0,02 ccm.

	Menge des 5 %-Ziegenblutes	Menge des Rinder-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl d. lös. Dosen für Ziegenblut
1.	3,0 ccm	0,60 1/10	2,40	1 l. D.
2.	—	1,20 —	1,80	2 l. D.
3.	—	1,80 —	1,20	3 l. D.
4.	—	2,40 —	0,60	4 l. D.
5.	—	3,00 —	0	5 l. D.
6.	—	0,36 unverd.	2,64	6 l. D.
7.	—	0,42 —	2,58	7 l. D.
8.	—	0,48 —	2,52	8 l. D.

Die Versuchsanordnung war im weiteren Verlauf des Experimentes die übliche.

Sediment:

A. Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Ziegenblut auf Rinderblut.	B. Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Ziegenblut auf Ziegenblut.
1 l. D. keine neue Lösung	1 l. D. keine neue Lösung
2 l. D. deutl. „ „	2 l. D. starke „ „
3 l. D. starke „ „	3 l. D. fast komplett
4 l. D. fast komplett	4 l. D. komplett
5 l. D. „ „	5 l. D. „
6 l. D. komplett	6 l. D. „
7 l. D. „	7 l. D. „
8 l. D. „	8 l. D. „

Abguß:

1—3 l. D. 2,0 ccm Abguß + 1,0 ccm Zgbl. + 0,1 ccm Kompl.: Spürchen
4—5 l. D. 2,0 „ „ + 1,0 „ „ + 0,1 „ „ Spuren
6—8 l. D. 2,0 „ „ + 1,0 „ „ + 0,1 „ „ wenig
1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: Spuren
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Spürchen in der Kuppe
1,0 „ Rinderblut + 0,1 „ Komplement: Spuren
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null

VI.

Versuch mit Rinder-Kaninchen-Amboceptor. Die einzelne lösende Dosis dieses Amboceptors für 1,0 ccm Ziegenblut betrug 0,0028 ccm.

	Menge des 5 %-Ziegen-blutes	Menge des Rinder-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl d. lös. Dosen für Ziegenblut
1.	3,0 ccm	0,84 1/100	2,16	1 l. D.
2.	—	1,68 —	1,32	2 l. D.
3.	—	2,52 —	0,48	3 l. D.
4.	—	0,34 1/10	2,66	4 l. D.
5.	—	0,42 —	2,58	5 l. D.
6.	—	0,50 —	2,50	6 l. D.
7.	—	0,59 —	2,41	7 l. D.
8.	—	0,67 —	2,33	8 l. D.

Sediment:

A. Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Ziegenblut auf Rinderblut.	B. Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Ziegenblut auf Ziegenblut.
1 l. D. keine neue Lösung	1 l. D. keine neue Lösung
2 l. D. deutl. „ „	2 l. D. stark
3 l. D. stark	3 l. D. f. komplett
4 l. D. f. komplett	4 l. D. komplett
5 l. D. wohl komplett	5 l. D. „
6 l. D. komplett	6 l. D. „
7 l. D. „	7 l. D. „
8 l. D. „	8 l. D. „

Abguß:

1—2 l. D.	2,0 ccm Abguß	+ 1,0 ccm Ziegenbl.	+ 0,1 ccm Kompl.:	Null
3 l. D.	2,0 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „ „	Spuren
4 l. D.	2,0 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „ „	wenig
5 l. D.	2,0 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „ „	mäßig
6—7 l. D.	2,0 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „ „	stark
8 l. D.	2,0 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „ „	Null

1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: Spuren
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Spürchen in der Kuppe
1,0 „ Rinderblut + 0,1 „ Komplement: Spuren
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null

In den nächstfolgenden Versuchen wurde die Bindung, wie gesagt, mit entprechendem Blut, der Übergang auf Ziegenblut und Rinderblut bewerkstelligt.

VII.

Versuch mit Ziegen-Kaninchen-Amboceptor, dessen einzelne lösende Dosis für Ziegenblut 0,0008 ccm, für Rinderblut 0,01 ccm betrug.

	Menge des 5%-Ziegenblutes	Menge des Ziegen-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl d. lös. Dosen für Ziegenblut
1.	2,0 ccm	0,64 1/100	0,36	4 l. D.
2.	—	0,96 —	0,04	6 l. D.
3.	—	0,13 1/10	0,87	8 l. D.
4.	—	0,16 —	0,84	10 l. D.
5.	—	0,19 —	0,81	12 l. D.
6.	—	0,26 —	0,74	16 l. D.
7.	—	0,32 —	0,68	20 l. D.
8.	—	0,36 —	0,64	24 l. D.
9.	—	0,45 —	0,55	28 l. D.
10.	—	0,52 —	0,48	32 l. D.
11.	—	0,58 —	0,42	36 l. D.

Die ersten drei Röhrchen in doppelter Anzahl. Nach einstündiger Bindung im Brutschrank und Zentrifugieren wird das Sediment gewaschen und in 3,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung verteilt. Aus jedem Zentrifugierröhrchen wird in das entsprechende Reagensglas je 1,5 ccm von der Aufschwemmung eingebracht. In den drei Röhrchen der ersten Reihe wird der Übergang des Amboceptors in gewöhnlicher Weise auf 1,0 ccm Ziegenblut, in den 11 Röhrchen der zweiten Reihe auf 1,0 ccm Rinderblut bewerkstelligt. Resultate:

Sediment:

A. Übergang des Ziegen-Kaninchen-Amboceptors von Ziegenblut auf Ziegenblut.	B. Übergang des Ziegen-Kaninchen-Amboceptors von Ziegenblut auf Rinderblut.
4 l. D. stark (Sediment klein)	4 l. D. keine neue Lösung
6 l. D. fast komplett	6 l. D. „ „ „
8 l. D. komplett	8—36 l. D. „ „ „

Abguß:

4—8	l. D. 1,5 ccm Abguß + 1,0 ccm Zgbl. + Kompl.:		Spürchen
10—16	l. D. 1,5 „ „ + 1,0 „ „ + „		Spuren
20—28	l. D. 1,5 „ „ + 1,0 „ „ + „		mäßig
32—36	l. D. 1,5 „ „ + 1,0 „ „ + „		fast komplett

VIII.

Das Resultat des vorstehenden Versuches beweist, daß selbst bei 36 lösenden Amboceptordosen für Ziegenblut (ca. 3 Dosen für Rinderblut) ein wahrnehmbarer Übergang des Amboceptors vom Ziegenblut auf Rinderblut nicht beobachtet wird.

Infolgedessen wurden in diesen Versuchen noch größere Dosen genommen, und zwar 40 bis 100. Das Experiment wurde mit anderem Ziegen-Kaninchen-Amboceptor ausgeführt, da dieser Amboceptor dank seinem besseren Bindungsvermögen in diesem Falle geeigneter war. Die Bindung wurde in 2 Röhrchenreihen bewerkstelligt.

	Menge des 5%-Ziegenblutes	Menge des Ziegen-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl der lös. Dosen für Ziegenblut
1.	2,0 ccm	0,72 $^1/_{10}$	0,28	ungefähr 40 l. D.
2.	—	0,90 —	0,10	„ 50 l. D.
3.	—	1,18 —	0	„ 60 l. D.
4.	—	1,26 —	0	„ 70 l. D.
5.	—	1,44 —	0	„ 80 l. D.
6.	—	1,62 —	0	„ 90 l. D.
7.	—	1,80 —	0	„ 100 l. D.

Im übrigen unterschied sich das Experiment in keiner Weise vom vorigen. Resultate:

Sediment:

A.	B.
Übergang des Ziegen-Kaninchen-Amboceptors von Ziegenblut auf Ziegenblut.	Übergang des Ziegen-Kaninchen-Amboceptors von Ziegenblut auf Rinderblut.
40—100 l. D. komplett	40—100 l. D. keine neue deutliche Lösung.

Abguß:

40—50 l. D. 1,5 ccm Abguß + 0,1 ccm Kompl. + 1,0 ccm Zgbl. f. kompl.
60—100 l. D. 1,5 „ „ + 0,1 „ „ + 1,0 „ „ kompl.

1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: wenig
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null
1,0 „ Rinderblut + 0,1 „ Komplement: Spuren
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null

IX.

Versuch mit Rinder-Kaninchen-Amboceptor, dessen lösende Dosis für Rinderblut 0,006 ccm, für Ziegenblut 0,014 ccm betrug.

	Menge des 5 %-Rinderblutes	Menge des Rinder-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl der lös. Dosen für Rinderblut
1.	3,0 ccm	0,36 $^1/_{10}$	2,64	ungefähr 2 l. D.
2.	—	0,54 —	2,46	„ 3 l. D.
3.	—	0,72 —	2,28	„ 4 l. D.
4.	—	0,90 —	2,10	„ 5 l. D.
5.	—	1,08 —	1,92	„ 6 l. D.
6.	—	1,26 —	1,74	„ 7 l. D.
7.	—	1,44 —	1,56	„ 8 l. D.
8.	—	1,62 —	1,38	„ 9 l. D.
9.	—	0,36 unverd.	2,64	„ 20 l. D.
10.	—	0,72 —	2,28	„ 40 l. D.
11.	—	1,44 —	1,56	„ 80 l. D.
12.	—	1,80 —	1,20	„ 120 l. D.

Nach der Bindung des Amboceptors wurde Sediment in der ersten Reihe von Röhrchen nach Zentrifugieren und Waschen in 6,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung in 6,0 ccm derselben Lösung aufgeschwemmt. Von diesen 6 ccm wurden zweimal je 2 ccm in zwei Reihen einfacher Röhrchen übertragen. Im weiteren Verlauf ging die Reaktion in gewöhnlicher Weise vor sich.

Sediment:

A. Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Rinderblut auf Rinderblut.	B. Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Rinderblut auf Ziegenblut.
2 l. D. stark (noch großer Niederschlag) 3 l. D. stark (Sediment kleiner) 4 l. D. fast komplett 5—100 l. D. komplett	2—100 l. D. kein Unterschied zwischen 2 und 100 l. D. In allen Röhrchen kleine Verminderung des Sediments. Vielleicht liegt die Ursache im hämolytischen Ziegenblut.

Abguß:

2—4 l. D.	2,0 ccm Abguß	+ 1,0 ccm Rdbl.	+ 0,1 ccm Kompl.:	wenig
5—7 l. D.	2,0 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „ „	stark
80 l. D.	2,0 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „ „	f. komplett
100 l. D.	2,0 „ „	+ 1,0 „ „	+ 0,1 „ „	komplett

1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: fast Null
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null
1,0 „ Rinderblut + 0,1 „ Komplement: Spuren
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null

X.

Der Versuch war eine Wiederholung des vorigen, die dadurch bedingt war, daß in sämtlichen Röhrchen B der Niederschlag der ungelösten Körperchen geringer war, als es in 1 ccm der 5 %igen Ziegenblutaufschwemmung vorhanden war. Die Ursache dieser Erscheinung lag augenscheinlich darin, daß das Ziegenblut 7 Tage alt und während des ersten

Waschens mit physiologischer Kochsalzlösung deutlich hämolytisch war und etwas agglutinierte. In diesem Falle wurde das Experiment mit frischem Ziegenblut angestellt. Die Einstellung des Amboceptors auf Rinderblut gab die lösende Dosis 0,005 ccm groß.

	Menge des 5%-Rinderblutes	Menge des Rinder-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl der lös. Dosen für Rinderblut
1.	3,0 ccm	0,45 1/10	2,55	3 l. D.
2.	—	0,60 —	2,40	4 l. D.
3.	—	0,75 —	2,25	5 l. D.
4.	—	0,90 —	2,10	6 l. D.
5.	—	1,05 —	1,95	7 l. D.
6.	—	0,31 unverd.	2,70	20 l. D.
7.	—	0,60 —	2,40	40 l. D.
8.	—	1,20 —	1,80	80 l. D.
9.	—	1,50 —	1,50	100 l. D.

Die Resultate waren denjenigen des vorigen Experimentes ähnlich mit dem Unterschiede jedoch, daß in der Röhrchenreihe B das Sediment der Quantität der hinzugesetzten roten Ziegenblutkörperchen vollkommen entsprach; außerdem fand dank der genauen Einstellung des Amboceptors in der Röhrchenreihe A vollständige Auflösung bei 6 lösenden Dosen statt.

Sediment:

A.

Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Rinderblut auf Rinderblut.

3 l. D. deutliche Aufhellung
4 l. D. Aufhellung stärker (stark)
5 l. D. fast komplett
6—100 l. D. komplett

B.

Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Rinderblut auf Ziegenblut.

3—100 l. D. keine neue Lösung. Die Größe des Sediments in allen Röhrchen gleicht vollkommen derjenigen des Sediments im Röhrchen mit nur Ziegenbl.

Abguß.

3—7 l. D. 2,0 ccm Abguß + 1,0 ccm Rdbl. + 0,1 ccm Kompl. wenig
20 l. D. 2,0 „ „ + 1,0 „ „ + 0,1 „ „ mäßig
40—100 l. D. 2,0 „ „ + 1,0 „ „ + 0,1 „ „ stark
1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: Null
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null
1,0 „ Rinderblut + 0,1 „ Komplement: Spuren in der Kuppe
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Spürchen in der Kuppe

XI.

Der Versuch war hinsichtlich der Durchführung und der Wahl der lösenden Amboceptordosen dem vorigen analog, nur mit einem anderen Rinder-Kaninchen-Amboceptor angestellt. Die lösende Dosis des letzteren betrug 0,00075 ccm.

	Menge des 5%-Rinderblutes	Menge des Rinder-Kan.-Amboc.	Menge der physiol. Kochsalzlös.	Zahl der lös. Dosen für Rinderblut
1.	3,0 ccm	0,68 1/100	2,32	3 l. D.
2.	—	0,90 —	2,10	4 l. D.
3.	—	1,13 —	1,87	5 l. D.
4.	—	1,35 —	1,65	6 l. D.
5.	—	1,58 —	1,42	7 l. D.
6.	—	0,45 1/10	2,55	20 l. D.
7.	—	0,90 —	2,10	40 l. D.
8.	—	1,80 —	1,20	80 l. D.
9.	—	2,25 —	0,75	100 l. D.

Die Resultate waren vollkommen identisch.

Sediment:

A.

Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Rinderblut auf Rinderblut.

3 l. D. deutliche Aufhellung
4 l. D. Aufhellung größer (stark)
5 l. D. fast komplett
6—100 l. D. komplett

B.

Übergang des Rinder-Kaninchen-Amboceptors von Rinderblut auf Ziegenblut.

3—100 l. D. keine neue Lösung. Die Größe des Sediments in allen Röhrchen gleicht derjenigen des Sediments im Röhrchen mit nur Ziegenblut.

Abguß:

3—4 l. D. 2 ccm Abguß + 1,0 ccm Rdbl. + 0,1 ccm Kompl.: wenig (deutliche Rötung).

5—7 l. D. 2 ccm Abguß + 1,0 ccm Rdbl. + 0,1 ccm Kompl.: Sediment stufenweise kleiner.

20—100 l. D. 2 ccm Abguß + 1,0 ccm Rdbl. + 0,1 ccm Kompl.: komplett.

1,0 ccm Ziegenblut + 0,1 ccm Komplement: Null
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Null
1,0 „ Rinderblut + 0,1 „ Komplement: Spuren in der Kuppe
1,0 „ „ + 0,1 „ Kochsalzlösung: Spürchen in der Kuppe.

Wenn wir die Resultate der ersten drei Experimente näher ins Auge fassen, so sehen wir, daß der Übergang des allgemeinen Teiles des mit Rinderblut gebundenen Ziegen-Kaninchen-Amboceptors auf Ziegen- und Rinderblut nicht ganz gleichmäßig vor sich geht. Während der Übergang einer ganzen lösenden Dosis auf Rinderblut zweimal bei 6 ursprünglich gebundenen Dosen und einmal bei 8 (die Bindung des Amboceptors war schwach, wie dies aus dem Abguß zu ersehen war) stattfand, wurde Übergang einer ganzen lösenden Dosis auf Ziegenblut einmal bei 3 und zweimal bei 4 lösenden Dosen beobachtet. Diese Differenz konnte vor allem auf die spezifische Avidität des Ziegen-Ka-

ninchen-Amboceptors dem Ziegenblut gegenüber zurückgeführt werden, dank der nicht nur der ganze Amboceptor besonderes Bestreben, sich mit dem entsprechenden Blute zu verbinden, besitzt, sondern diese Eigenschaft besitzt auch, wenn man so sagen darf, der Stammteil desselben, d. h. derjenige Teil, der nicht nur dem betreffenden Ziegenblut, sondern auch dem ihm verwandten Rinderblut gemein ist; mit anderen Worten: der allgemeine Teil des Amboceptors besitzt, indem er aus der ganzen Masse des Immunkörpers ausgesondert wird, immerhin eine besondere Affinität zu demjenigen Blut, durch dessen Injektion die Bildung des Immunkörpers hervorgerufen war. Mit diesem Blute vereinigt er sich besonders energisch. Diese Annahme erweist sich aber als vollkommen haltlos, wenn wir die Resultate der folgenden drei Versuche mit Rinder-Kaninchen-Amboceptor einer näheren Betrachtung unterziehen. Hier müßten wir vollständigen Übergang einer lösenden Dosis auf Rinderblut bei geringerer Quantität der ursprünglich gebundenen Dosen als auf Ziegenblut beobachten, während die Verhältnisse dieselben bleiben wie in den ersten drei Experimenten: in zwei Fällen wurde vollständiger Übergang der einen lösenden Dosis auf Rinderblut bei 6 ursprünglich gebundenen Dosen beobachtet, während derselbe Übergang auf Ziegenblut schon bei 4 und in einem Falle sowohl auf Rinderblut, wie auch auf Ziegenblut bei 4 ursprünglich gebundenen Dosen vor sich ging. Das vollkommen gleichartige Resultat sämtlicher 6 Experimente läßt annehmen, daß die Ursache der in Rede stehenden Erscheinung nicht im Amboceptor und nicht in irgend einer Eigenschaft der receptorischen Gruppen der roten Blutkörperchen, welche zum entsprechenden Amboceptor in Beziehung stehen, sondern in den Eigenschaften der Receptorenformel liegt, die außerhalb etwaiger Abhängigkeit vom Immunkörper liegen. In der Tat, wenn wir sehen, daß der Übergang des allgemeinen Teiles des Amboceptors, mag derselbe vom Ziegen-Kaninchen- oder vom Rinder-Kaninchen-Amboceptor herrühren, auf Ziegenblut leichter als auf Rinderblut vor sich geht, so ist es am natürlichsten anzunehmen, daß die Ursache der Erscheinung in der Blutart selbst liegt. Man kann kaum dabei annehmen, daß das Ziegenblut eine besondere Avidität zum allgemeinen Teile des Amboceptors habe,

oder daß zur Auflösung einer gewissen Quantität Ziegenblut eine relativ minimale Quantität der mit Amboceptoren versehenen Receptoren erforderlich ist, als zur Lösung derselben Quantität Rinderblut. Am einfachsten ist es anzunehmen, daß das Ziegenblut überhaupt als solches eine geringere Quantität Receptoren als das Rinderblut besitzt, aus welchem Grunde auch die einzelne lösende Dosis für dasselbe geringer ist. Daraus ergibt sich die unmittelbare Folge: der leichtere Übergang auf dasselbe der einen Dosis des mit anderen Erythrocyten gebundenen Amboceptors, wobei es gleichgültig ist, ob es sich um Ziegen- oder Rinder-Erythrocyten handelt. Eine außerordentlich beredte Bestätigung dieser Annahme ist folgende Tatsache. Wenn wir das Verhältnis zwischen den einzelnen lösenden Dosen eines jeden Amboceptors für Ziegenblut oder Rinderblut betrachten, so ersehen wir, daß, während bei Ziegen-Kaninchen-Amboceptoren das Verhältnis der einen lösenden Dosis für das Ziegenblut zu einen lösenden Dosis für Rinderblut 1 : 15, 1 : 7,5 und 1 : 12,5 betrug, bei Rinder-Kaninchen-Amboceptoren 1 : 3 und 1 : 4 ausmachte.

Amboceptor	Datum der Einstellung	Größe einer lösend. Dosis f. Zgbl.	Größe einer lösend. Dosis f. Rdbl.	Verhältnis
Zgkan. v. 28. IX.	3. XI.	0,00050	0,00750	1:15
	5. XI.	0,00080	0,00600	1:7,5
Zgkan. v. 20. X.	28.—29. X.	0,00080	0,01000	1:12,5
Rdkan. v. 14. XI.	19.—23. XI.	0,01400	0,00500	3:1
Rdkan. v. 21. XI.	23.—26. XI.	0,00280	0,00075	4:1

Es ergibt sich somit, daß der Rinder-Kaninchen-Amboceptor in weit stärkerem Grade die Fähigkeit besitzt, Ziegenblut zu lösen als der Ziegen-Kaninchen-Amboceptor dem Rinderblut gegenüber. Dieselben Verhältnisse ergeben sich aus dem weit größeren Material von P. Ehrlich und I. Morgenroth (3) in der oben zitierten Arbeit. So sind auf S. 572 Resultate mitgeteilt, welche darauf hinweisen, daß bei Rinder-Kaninchen-Amboceptoren das Verhältnis der einen lösenden Dosis für Rinderblut zu der einen lösenden Dosis für Ziegenblut 1 : 1,5 bis 1 : 17 beträgt, während die eine lösende Dosis für Ziegenblut zu der einen lösenden Dosis für Rinderblut in Ziegen-Kaninchen-Amboceptoren sich verhält wie 1 : 2,4 bis 1 : 33. Hätte

es sich hier um größeren Gehalt des Rinder-Kaninchen-Amboceptors am allgemeinen Teil für Ziegenblut und für Rinderblut gehandelt, so hätte bei unseren Experimenten mit Übergang ein und desselben Amboceptors auf Ziegen- und Rinderblut eine größere Differenz nicht beobachtet werden können. Es besitzen somit weder die einen noch die anderen roten Blutkörperchen dem für sie gemeinsamen Teile des Amboceptors gegenüber spezifische Avidität. Dieser Teil ist augenscheinlich ein und derselbe Körper, ob er vom Ziegen-Kaninchen-Amboceptor oder Rinder-Kaninchen-Amboceptor isoliert ist. Die Receptoren der roten Blutkörperchen der Ziege und des Rindes, die mit dem für diese beiden Blutarten gemeinsamen Teile des Amboceptors in Verbindung treten, sind augenscheinlich ihrer Beschaffenheit nach identisch, sind aber im Ziegenblute in geringerer Quantität (der ärmeren Receptorenformel des roten Blutkörperchens der Ziege überhaupt entsprechend) vorhanden als im Rinderblut.

Wenn wir uns nun den letzten 5 Experimenten zuwenden, in denen die Bindung des Amboceptors durch die entsprechende Blutart, der Übergang desselben auf beide Blutarten, nämlich Ziegenblut und Rinderblut bewerkstelligt wurde, so ersehen wir, daß die Resultate dieser Experimente außerordentlich überraschend und originell sind. Während der Übergang der einen lösenden Dosis vom mit Ziegenblut gebundenen Ziegen-Kaninchen-Amboceptor auf Ziegenblut ungefähr bei 6 lösenden Dosen stattfand, fand dieser Übergang auf Rinderblut augenscheinlich überhaupt nicht statt. Desgleichen geht der mit Rinderblut gebundene Rinder-Kaninchen-Amboceptor auf Rinderblut in der Quantität von 1 lösenden Dosis bei 6 ursprünglich gebundenen Dosen auf Ziegenblut augenscheinlich überhaupt nicht über. Aus dem Versuch VIII, der mit Ziegen-Kaninchen-Amboceptor angestellt wurde, dessen einzelne lösende Dosis für Rinderblut um 12,5mal größer als für Ziegenblut war, geht hervor, daß weder bei 80 noch bei 90 noch sogar bei 100 lösenden Dosen ein Übergang des Amboceptors auf Rinderblut stattfindet,

mit anderen Worten: trotzdem der gebundene Amboceptor im Überschuß 6 bis 8 für Rinderblut lösende Dosen enthielt, erwies sich dieser Teil desselben dem letzteren Blute gegenüber als vollkommen immobil. Vollkommen analoge Resultate sehen wir auch in den Versuchen mit Rinder-Kaninchen-Amboceptor und Ziegenblut. Hier tritt die Erscheinung dank der oben erwähnten Differenz zwischen Rinderblut und Ziegenblut noch deutlicher zutage. Wir sehen nicht einmal Spuren von Übergang des Amboceptors auf Ziegenblut, selbst bei Vorhandensein von 30 für diese Blutart lösenden Dosen (100 für Rinderblut). (X. Versuch).

Diese Tatsachen, welche sich von den Resultaten der ersten Versuchsreihe so unterscheiden, stehen gleichsam im Widerspruch mit der elektiven Fähigkeit der Receptorengruppen der Erythrocyten, sich mit denjenigen Immunkörpern zu verbinden, deren cytophile haptophore Gruppen mit ihnen verwandt sind.

Es ist schwer anzunehmen, daß die Ursache der Erscheinung in den veränderten Eigenschaften des gemeinsamen Teiles des Amboceptors oder in der Tatsache liegen soll, daß dieser gemeinsame Teil mit dem Blute verbunden ist, durch dessen Einspritzung die Bildung desselben hervorgerufen wurde, d. h. man kann hier kaum eine schädliche Manifestation der oben erwähnten Avidität erblicken, da oben bereits erwiesen ist, daß die Avidität beim Übergang des Amboceptors keine sichtbare Rolle spielt, mag dieser Übergang auf Ziegenblut oder auf Rinderblut stattfinden. Am wahrscheinlichsten wäre die Annahme, daß das Ausbleiben des Übergangs im betreffenden Falle durch das gleichzeitige Vorhandensein nicht nur des allgemeinen, sondern auch des spezifischen Teiles des Amboceptors bedingt wird. Nun fragt es sich, in welcher Weise kann das Vorhandensein des spezifischen Teiles des Amboceptors den Übergang des allgemeinen Teiles in diesem Falle behindern. Ist es doch bekannt, daß dieses Vorhandensein im freien Amboceptor das rote Blutkörperchen des verwandten Tieres nicht behindert, den allgemeinen Teil aufzunehmen. Zugleich wird kaum jemand zweifeln, daß beim Übergang des Ziegen-Kaninchen-Amboceptors von Ziegenblut auf Ziegenblut neben dem spezifischen Teile des

Amboceptors der allgemeine Teil desselben nicht übergeht. Infolgedessen muß man annehmen, daß die Reaktion der einfachen Bindung, bei der die Receptoren von Erythrocyten ihre elektive Fähigkeit stets frei entfalten, sich von der komplizierteren Reaktion des Übergangs des Amboceptors wesentlich unterscheidet. Hier handelt es sich augenscheinlich nicht um einfache Aufnahme von minimalen Amboceptormengen, die sich in der umgebenden Flüssigkeit in Lösung befinden, sondern um einen komplizierteren Prozeß. Augenscheinlich findet hier eine engere Berührung der Receptoren, die mit Amboceptor versehen sind, und derjenigen, die keinen Amboceptor haben, miteinander statt, wobei die ersteren den Amboceptor-Überschuß den letzteren übermitteln. Diese Erscheinung macht augenscheinlich nicht nur das Vorhandensein von gleichartigen Receptoren und eines für dieselben gemeinsamen Amboceptors in den Erythrocyten zur Bedingung, sondern stellt noch weitere feinere Bedingungen, darunter folgende: Wenn es in den roten Blutkörperchen eine Reihe anderer Receptoren gibt, die miteinander nicht identisch sind, so dürfen sie nicht ersetzt werden. Letztere Tatsache läßt uns unwillkürlich annehmen, daß die verschiedenen Receptoren des Blutkörperchens: α, β, γ usw. keine in vollem Sinne des Wortes voneinander unabhängige Gebilde darstellen, daß sie vielmehr, wenn sie ersetzt werden, in die Reaktion als ein gemeinsames Ganzes eintreten. Ein Übergang von mit Ziegenblut gebundenem Ziegen-Kaninchen-Amboceptor auf Rinderblut findet wahrscheinlich aus dem Grunde nicht statt, weil in diesem Falle zwei vollkommen verschiedene, Affinität nicht besitzende Substanzen: $\beta_b + \gamma_g$ und $\alpha + \beta$, miteinander in Reaktion treten müssen, während die Bindungen $\beta_b + \gamma$ und $\gamma + \beta$ Substanzen sind, welche in Verbindung miteinander treten können. Worin die Ursache der in Rede stehenden Erscheinungen liegt, ob darin, daß die verschiedenen Receptoren im Erythrocytenmolekül der Natur nach außerordentlich nahe liegen und eng, untrennbar miteinander verbunden sind, oder ob die Bindung erst nach deren Ersatz durch Immun-

körper eintritt, oder ob hier irgendwelche andere, noch unbekannte Momente eine Rolle spielen, ist natürlich schwer zu sagen. Es ist möglich, daß in der in Rede stehenden Erscheinung ein zweckmäßiger Eingriff der Natur liegt, dank dem die assimilierten Substanzen in der Gewebszelle fest fixiert und nicht über andere Gewebe verteilt werden, welche mit der betreffenden Gewebszelle gemeinsame Receptoren haben. Es ist auch möglich, daß dank dieser Erscheinung der Organismus den schädlichen Einfluß verschiedener toxischer Substanzen häufig lokalisiert.

Literatur.

1. Jules Bordet, Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le sérum d'animaux injectés de sang défibriné. Annales de l'Inst. Pasteur, 12. 692, 1898.
2. P. Ehrlich u. I. Morgenroth, Zur Theorie der Lysinwirkung. Berl. klin. Wochenschr. 1899, Nr. 1, 6 bis 9.
3. P. Ehrlich u. I. Morgenroth, Über Hämolysine. Sechste Mitteilung. Berl. klin. Wochenschr. 1901, Nr. 21, 569 bis 574; Nr. 22, 598.
4. Dungern, Gesamte Arbeiten zur Immunitätsforschung. Prof. P. Ehrlich, Berlin 1904. Zit. nach H. Lüdtke: Zur Spezifität der Antikörper. Centralbl. f. Bakt. 38, 95 1905.
5. P. Ehrlich, Spezielle Pathologie und Therapie von Prof. Nothnagel, Bd. 4: Leukämie. Schlußbetrachtungen, S. 171 bis 183.
6. Jacques Loeb, Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen. Leipzig 1906, S. 1 bis 10, 63 bis 88, 112 bis 152.
7. I. Morgenroth, Über die Bindung hämolytischer Amboceptoren. Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 2.
8. H. Lüdtke, Zur Spezifität der Antikörper. Centralbl. f. Bakt. 38, 95, 1905.

Versuche über die komplementhemmende und komplementbindende Fähigkeit von Seifen.

Von

Paul Hessberg.

(Aus der bakteriologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 26. Juni 1909.)

Während die sich immer mehr häufenden praktischen Erfahrungen über die Verwendbarkeit der Komplementbindungsmethode zur Diagnose der Syphilis sowie der progressiven Paralyse und Tabes zu einer fast einmütigen Anerkennung des diagnostischen Wertes der Wassermannschen Reaktion geführt haben, hat sich eine wesentliche Änderung in der theoretischen Auffassung derselben vollzogen.

Es kann heute keinem Zweifel mehr unterliegen, daß die Reaktion, welche Wassermann und seine Mitarbeiter[1]) und nach ihnen eine Anzahl von Autoren als eine einfache Anwendung der Gengou-Bordetschen[2]) Methode der Komplementbindung angesehen hatten, mit dieser in ihrem Wesen nichts zu tun hat. Es liegt also hier nicht der zuerst vorausgesetzte einfache Fall vor, daß der wässerige Extrakt spirochaetenhaltiger Organe als Antigen dient, während der mit diesem Antigen reagierende spezifische Antikörper im Serum Syphilitischer resp. in der Cerebrospinalflüssigkeit Paralytischer und Tabischer enthalten ist, sondern es handelt sich um Vorgänge, deren Effekt zwar

---

[1]) A. Wassermann, A. Neisser, C. Bruck, Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 19. — A. Wassermann, A. Neisser, C. Bruck und A. Schucht, Weitere Mitteilungen über den Nachweis spezifisch luetischer Substanzen durch Komplementverankerung. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. 55, 1906.

[2]) Gengou u. Bordet, Annales de l'Inst. Pasteur 15, Nr. 5, 1901.

ebenso wie bei der Gengou-Bordetschen Komplementbindung in der Unterdrückung der Komplementwirkung zu erkennen ist, die aber in ihrem Wesen noch vollständig dunkel erscheinen.

Nachdem durch die Erkenntnis, daß auch wässerige Extrakte normaler Organe die Extrakte spirochaetenhaltiger Organe ersetzen können,[1]) die Wassermannsche Reaktion als nicht mehr den spezifischen Immunitätsreaktionen zugehörig angesehen werden durfte, eröffnete sich die Möglichkeit, zu untersuchen, ob für die Reaktion nicht etwa chemisch bekannte Substanzen verantwortlich zu machen seien. Dieser Fall lag natürlich in gleicher Weise für beide bei der Reaktion in Betracht kommenden Komponenten vor, sowohl für die Organextrakte wie für das Blutserum resp. die Cerebrospinalflüssigkeit. Wenn auch bei den letzteren beiden die reagierende Substanz erst im Gefolge syphilitischer oder gewisser postsyphilitischer Erkrankungen auftritt, ihr Erscheinen also im klinischen Sinne gewissermaßen spezifisch ist, so berechtigt doch bei der gegenwärtigen Sachlage nichts, sie als einen Antikörper aufzufassen. Daß die aufklärende Forschungsarbeit sich bis jetzt fast ausschließlich mit der in den Organextrakten befindlichen Komponente beschäftigt hat, beruht wohl auf der schwereren Zugänglichkeit und vor allem der für ausgedehnte Versuche zu geringen Menge des zur Verfügung stehenden Materials an Serum oder Cerebrospinalflüssigkeit.

Die vereinzelte Angabe von Levaditi und Yamanouchi[2]), daß der alkoholische Extrakt des Serums von Syphilitischen die wirksame Komponente enthält, hat bisher eine Bestätigung nicht erfahren.

Für die Erforschung der Extraktkomponente wies eine gangbare Richtung die Beobachtung, daß dieselbe alkohollöslich ist. Die Alkohollöslichkeit bildete den Ausgang für eine Reihe von Versuchen mit alkohollöslichen Substanzen, deren An-

---

[1]) Marie u. Levaditi, Annales de l'Inst. Pasteur 1907, Nr. 2. — Weil, Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 18 (Tumoren). — Michaelis, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 35. — Weil u. Braun, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 49. — Fleischmann, Verein f. inn. Med., 3. Juli 1907. — Landsteiner, Mülller u. Pötzel, Wiener klin. Wochenschr. 1907, Nr. 50.

[2]) Levaditi und Yamanouchi, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1907, Nr. 38.

wesenheit in Organen, speziell in der Leber, in Betracht kam. Wassermann, Porges und Meier[1]) konnten an Stelle der Organextrakte Lecithinsuspensionen verwenden. Levaditi und Yamanouchi[2]) fanden, daß gallensaure Salze mit syphilitischen Sera reagieren, und endlich wiesen Sachs und Altmann[3]) die Reaktionsfähigkeit des ölsauren Natron nach.

Da nach den Versuchen von Sachs und Altmann das ölsaure Natron zweifellos von den bis jetzt studierten alkohollöslichen Substanzen am geeignetsten für die Reaktion ist und zu hoffen war, daß gerade mit Seifenlösungen, welche den Vorteil größerer chemischer Reinheit bieten, ein tiefer eindringendes Studium des Gegenstandes möglich ist, habe ich unter Leitung von Prof. Morgenroth im Anschluß an die Mitteilungen von Sachs und Altmann eine Reihe von Versuchen angestellt und möchte im folgenden über einige derselben berichten.[4])

In den Kreis der Untersuchungen wurde neben dem oleinsauren Natron eine Reihe anderer Seifen gezogen, nämlich oleinsaures Kali, palmitinsaures Natron und stearinsaures Kali. Entsprechende Versuche mit valeriansaurem Natron ergaben, daß dasselbe keine komplementbindenden Eigenschaften besitzt, und daß ihm auch die den Seifen eigentümliche hämolytische Fähigkeit abgeht.

Die Vorbedingung für eine brauchbare und zuverlässige Versuchsanordnung bestand vor allem darin, daß die zu den Versuchen dienenden Sera Syphilitischer auch wirklich das typische Verhalten in bezug auf die Wassermannsche Reaktion in der Form, in der sie gewöhnlich ausgeführt wird, zeigten; denn schließlich müssen sich alle neuen Untersuchungen an die übliche Komplementbindungsmethode anschließen, wenn nicht

---

[1]) Wassermann, Porges u. Meier, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 51. — Landsteiner, Müller und Pötzel, loc. cit. — Levaditi und Yamanouchi, loc. cit.

[2]) Levaditi und Yamanouchi, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1907, 741.

[3]) Sachs u. Altmann, Über die Wirkung des oleinsauren Natrons bei der Wassermannschen Reaktion auf Syphilis. Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10.

[4]) Die Kosten der Versuche wurden aus den Prof. Bruhns und Prof. Morgenroth aus der Eduard Simon-Stiftung zur Verfügung gestellten Mitteln bestritten.

schwerwiegende Irrtümer entstehen sollen. Alle Sera, die für die folgenden mit Seifen angestellten Versuche verwandt wurden, sind vorher auf ihr Komplementbindungsvermögen mittels einer Versuchsanordnung geprüft, die wir zunächst kurz beschreiben wollen.[1])

Die Sera waren stets durch halbstündiges Erwärmen auf 55° inaktiviert. Es gelangte immer alkoholischer Extrakt aus syphilitischen Lebern zur Verwendung. Die Lebern wurden zunächst mit Seesand fein verrieben und hierauf Alkohol im Verhältnis 10:1 oder 5:1 zugesetzt. Nach mehrstündigem Schütteln im Schüttelapparat blieb die klare gelbe Flüssigkeit dauernd über den sich rasch zu Boden setzenden Organpartikelchen stehen und wurde zum jedesmaligen Gebrauche vorsichtig mit der Pipette abgehoben. Zum Versuche wurde der Extrakt jedesmal frisch im Verhältnis 1:10 oder 1:5 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Es wurde stets 1 ccm dieser Verdünnung angewandt. Selbstverständlich wurde die Brauchbarkeit der Extrakte durch fortlaufende Prüfung mit syphilitischen Sera von bekannter ablenkender Funktion dauernd kontrolliert, so daß Irrtümer soviel als möglich ausgeschlossen waren. Als Komplement wurde ausschließlich Meerschweinchenserum, frisch oder im „Frigo" aufbewahrt, verwandt, und zwar in der Menge von 0,1 ccm. Ziegenblut, welches durch Waschen von Serum befreit war, wurde in der Menge von 1 ccm einer 5%igen Aufschwemmung benutzt. Der Amboceptor war von Kaninchen durch Vorbehandlung mit Ziegenblutkörperchen gewonnen; seine Menge betrug das Dreifache der lösenden Dosis. Das Gesamtvolumen in den einzelnen Röhrchen betrug in der Regel 3,5 ccm.

Wir geben im folgenden das Beispiel eines derartigen Versuches, aus dem das Kontrollverfahren ohne weiteres zu ersehen ist.

Tabelle I.

Versuch vom 3. IV. 08.

A. Alkoholischer Luesleberextrakt 1,0 $^1/_{10}$,
B. Serum Sch. $^1/_2$ Stunde 55°,
„ K. do.
C. Meerschweinchenserum (Komplement) 0,1,
D. Ziegen-Kaninchen-Amboceptor 0,3 $^1/_{1000}$,
E. Ziegenblut 5% 1mal gewaschen 1,0.

	Extrakt	Meerschw.-Ser.	Ambocept.	Menschen-Ser. Serum Sch.	Resultat
1.	1,0	0,1	0,3 $^1/_{1000}$	0,2	komplett
2.	„	„	„	0,1	„

[1]) S. Morgenroth u. Halberstädter, Deutsche Klinik, Bd. 12, 1909.

	Extrakt	Meerschw.-Ser.	Ambocept.	Menschen-Ser.	Resultat
				Serum K.	
3.	„	„	„	0,2	0
4.	„	„	„	0,1	0
5.	2,0	„	„	—	komplett
6.	1,0	„	„	—	„
				Serum Sch.	
7.	—	„	„	0,4	„
8.	—	„	„	0,2	„
				Serum K.	
9.	—	„	„	0,4	„
10.	—	„	„	0,2	„
11.	—	„	„	—	„
12.	—	—	„	—	0
13.	—	0,1	—	—	0
14.	2,0	—	—	—	komplett
15.	Blut allein	—	—	—	0

Die Untersuchung der ablenkenden Fähigkeit der verschiedenen Seifen stößt auf nicht unerhebliche Schwierigkeiten, welche begründet liegen in dem Verhalten der Seifen zu den Blutkörperchen einerseits, zum Komplement andrerseits.

Wie besonders durch die Arbeiten von Noguchi, v. Liebermann und seinen Mitarbeitern, M. Friedemann und F. Sachs, F. Sachs, H. Sachs und Altmann[1]) bekannt ist, üben Seifen eine oft recht starke hämolytische Wirkung auf alle Arten von Blutkörperchen aus.

Es wäre überhaupt unmöglich, mit erheblicheren Mengen einer Seifenlösung die typischen Komplementbindungsversuche anzustellen, wenn nicht die hämolytische Wirkung der Seife durch normales Serum, sowohl aktives wie inaktives, in hohem Maße gehemmt würde. In dieser Richtung liegen Untersuchungen von den ebengenannten Autoren vor, außerdem auch von Landsteiner und P. Ehrlich. Die Verhältnisse, die hier in Betracht kommen, sind durchaus denjenigen ähnlich, welche man bei der üblichen Syphilisdiagnostik durch Komplementbindung in gewissen Fällen antrifft; eine Anzahl der zu den Versuchen dienenden Organextrakte ist an und für sich hämo-

[1]) Noguchi, Proceedings of the society for experimental biology and medicin 1907, Nr. 3. — v. Liebermann, Arch. f. Hygiene 62, 277, 1907 und diese Zeitschr. 4. 25, 1907. — M. Friedemann u. F. Sachs, diese Zeitschr. 12, 3. u. 4. Heft, 1908. — F. Sachs, Ebenda.

lytisch und erlaubt trotzdem die Anstellung der Reaktion, da diese Extrakthämolyse durch die Gegenwirkung der gleichzeitig vorhandenen Sera ausgeschaltet wird. Diese Verhältnisse sind schon vor Jahren eingehend von Korschun und Morgenroth[1]) erforscht worden; es erscheint wahrscheinlich, daß auch bei der Hämolyse durch die von diesen Autoren benutzten Organextrakte eine Seifenwirkung vorliegt. Hierauf hat bereits Levaditi[2]) hingewiesen, der annahm, daß bei der Autolyse der Organe Seifen entstehen. Sollten weitere Forschungen ergeben, daß für die Komplementbindung, wie sie durch Organextrakte hervorgebracht wird, wirklich so wie in den Versuchen von Sachs und Altmann Seifen in Frage kommen, so wäre die Möglichkeit, daß auch die hämolytischen Eigenschaften der Organextrakte auf deren Gegenwart beruhen, wahrscheinlicher gemacht.

Auf alle Fälle ist die Grundbedingung für unsere Versuche, daß zunächst die hämolytische Wirkung der einzelnen Seifen quantitativ festgestellt wird, fernerhin die antihämolytische Wirkung der für die betreffenden Versuche in Betracht kommenden Serumquantitäten. Wenn diese Bedingungen fehlen, ist an eine Analyse der im Komplementbindungsversuch zu beobachtenden Phänomene nicht zu denken, da die verschiedenen Grade der Hämolyse unter Umständen sowohl auf Seifenwirkung wie auf Amboceptor-Komplementwirkung beruhen können, für die beide ja ein und derselbe Indicator dient. Wir stellen daher zunächst den weiteren Versuchen unsere Beobachtungen über Seifenhämolyse und deren Hemmung durch Serum voraus und lassen dann die Versuche über Komplementhemmung durch Seife folgen.

Es haben nämlich Sachs und Altmann festgestellt, daß die Seifen an und für sich die Wirkung des zu den Versuchen dienenden Komplements des Meerschweinchenserums aufheben kann.

Zunächst lassen wir die Versuche über Seifenhämolyse und deren Hemmung durch Serum folgen.

Zu allen folgenden Versuchen wurde als Stammlösung eine 1%ige Lösung der betreffenden Seife in 0,85%iger Kochsalzlösung verwandt.

---

[1]) Korschun u. Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1902, Nr. 37.

[2]) Levaditi, Annales de l'Inst. Pasteur 1904.

Das oleinsaure Natron löst sich außerordentlich langsam bei ständigem stärkeren Durchschütteln bei Zimmertemperatur, sehr leicht bei Erhitzen auf 85 bis 90°. Die Lösung ist opalescierend; nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur bildet sich besonders bei der in der Kälte gelösten Seife ein starker, flockiger Niederschlag.

Ich untersuchte die Lösung dreier verschiedener Präparate, von denen das eine von C. A. F. Kahlbaum geliefert war, während zwei andere Präparate von E. Merck stammten. Die beiden letzteren unterschieden sich etwas in ihrem Aussehen, indem das eine großklumpig, das andere körnig war. In ihrer Löslichkeit und in dem Verhalten ihrer Lösungen waren sich die drei Präparate vollkommen gleich. Die 1 %igen Lösungen sind bei Zimmertemperatur lange haltbar und lassen in ihren Eigenschaften keine Veränderung erkennen.

Das oleinsaure Kali (Kahlbaum) ist wie bekannt leichter löslich und gibt wasserklare Lösungen.

Wegen der leichteren Löslichkeit der Kalisalze zogen wir das stearinsaure Kali dem Natronsalz vor. Wir benutzten ein Präparat von Kahlbaum. Trotz dieser leichteren Löslichkeit sind die Verhältnisse recht ungünstig, und es gelang nur durch besondere Vorsichtsmaßregeln, brauchbare Lösungen herzustellen. Eine 1 %ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung, die nur durch stärkeres Erwärmen herzustellen ist, wird bei 30° bis 35° wieder fest und stellt eine starre Gallerte dar, die sich nach längerem Stehen ziemlich stark verdichtet und reichlich Wasser auspreßt. Auch eine rasch hergestellte Verdünnung dieser Lösung im Verhältnis 1:10 bildet bald eine leicht bewegliche gallertige Masse. Zum quantitativen Arbeiten kann man deshalb nur frisch bereitete Lösungen verwenden, und zwar so, daß man die Lösung im Wasserbad bei 50° flüssig erhält und dieselbe rasch in die Reagensgläschen ausbläst.

Versuche, die Löslichkeitsverhältnisse durch Zusatz von wechselnden Mengen Glycerin, Methylalkohol und Lauge günstiger zu gestalten, führten zu keinem Ergebnis; ebensowenig Versuche, die Verdünnung in 8,5 %iger Rohrzuckerlösung herzustellen.

Ein Gemisch von 1,5 ccm einer 1 %igen Lösung von stearinsaurem Kali, 1 ccm Glycerin und 0,5 ccm einer 0,85 %igen Kochsalzlösung wird durch Phenolphthaleinzusatz schwach rot gefärbt. Beim Aufkochen klärt sich die trübe Lösung auf, und es tritt Entfärbung ein; beim Abkühlen kehrt die Rotfärbung zurück. Entsprechende Verhältnisse bietet das palmitinsaure Natron.

Die hämolytische Wirkung der verschiedenen Seifen wurde mit Ziegenblutkörperchen und Ochsenblutkörperchen geprüft,

und zwar wurde jedesmal 1 ccm einer 5 $^0/_0$igen von Serum befreiten Blutkörperchenaufschwemmung benutzt; das Gesamtvolumen betrug 2 ccm. Ich lasse einige Protokolle derartiger Versuche folgen.

Tabelle II.

Versuch vom 10. VI. 08.

Einstellung der verwandten fettsauren Salze (1 $^0/_0$ in physiologischer Kochsalzlösung) auf Ziegenblut.

	Natr. olein. Merck	Natr. olein. Kahlbaum	Natr. palmit.	Kal. olein.	Kal. stear.
1. 1,0 $^1/_{10}$	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,5 „	„	„	„	„	„
3. 0,25 „	„	„	Spur	„	Spur
4. 1,0 $^1/_{100}$	„	„	0	„	0
5. 0,75 „	„	„	0	stark	0
6. 0,5 „	„	fast „	0	Spur	0
7. 0,25 „	0	0	0	0	0

Bei Verwendung von Ochsenblut statt Ziegenblut stellten sich nur minimale Unterschiede heraus.

Oleinsaures Natron und oleinsaures Kali zeigen keine sehr großen Differenzen in ihrer hämolytischen Wirkung, dagegen ist die hämolytische Kraft des palmitinsauren Natrons und des stearinsauren Kalis erheblich geringer; sie beträgt etwa den zehnten Teil.

Es erschien uns deshalb aussichtsvoll, die beiden letzteren Seifenarten für die Komplementbindungsversuche zu benutzen, da hier die Möglichkeit gegeben war, weit größere Mengen zu verwenden als von den oleinsauren Salzen, ohne daß die hämolytische Wirkung den Versuch störte.

Diese Bestimmungen der hämolytischen Wirkungen der Seifen boten die Grundlage für die Feststellung der hemmenden Wirkung des Serums. Im folgenden seien einige der einschlägigen Versuche mitgeteilt.

Absteigende Mengen der 1 $^0/_0$igen Lösung des oleinsauren Natrons (Kahlbaum) wurden 1 Stunde lang mit 0,1 ccm durch $^1/_2$stündiges Erhitzen auf 56° inaktivierten Meerschweinchenserums bei 37° digeriert; dann wird je 1 ccm 5 $^0/_0$igen einmal gewaschenen Ziegenblutes zugesetzt. Die Proben werden in den Brutschrank gesetzt und nach den unten angegebenen Zeiten beobachtet.

Tabelle III und IV.

Versuche vom 8. V. 08.

Tabelle III.

Olein. Natr.	5′	15′	30′	45′	60′	90′	24 Std.
1. 0,3	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,2	„	„	„	„	„	„	„
3. 0,15	stark	„	„	„	„	„	„
4. 1,0 $^{1}/_{10}$	0	0	mäßig	„	„	„	„
5. 0,8	0	0	0	0	mäßig	„	„
6. 0,6	0	0	0	0	0	0	„
7. 0,4	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle IV.

Es wurden statt Ziegenblutkörperchen Hammelblutkörperchen verwandt.

Olein. Natr.	5′	15′	30′	45′	60′	90′	24 Std.
1. 0,3	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,2	„	„	„	„	„	„	„
3. 0,15	0	„	„	„	„	„	„
4. 1,0 $^{1}/_{10}$	0	0	„	„	„	„	„
5. 0,8	0	0	0	mäßig	„	„	„
6. 0,6	0	0	0	0	0	fast „	„
7. 0,4	0	0	0	0	0	0	0

0,1 ccm inaktives Meerschweinchenserum ist also imstande, etwa das 8fache der einfach lösenden Dosis des oleinsauren Natrons in seiner hämolytischen Wirkung völlig zu hemmen; 1 ccm Serum neutralisierte demnach die Wirkung von ca. 5 mg oleinsauren Natrons.

Für die komplementhemmende Wirkung des oleinsauren Natrons, die, wie bereits erwähnt zuerst von H. Sachs und Altmann beobachtet wurde, wurde von diesen Autoren vermutet, daß vielleicht freies Alkali, welches durch die hydrolytische Spaltung der Seifen in wässeriger Lösung entsteht, in Betracht kommt. Sie weisen darauf hin, daß dieses Phänomen der Komplementhemmung stets zu beobachten ist, wenn man in der Weise, wie wir es bei den oben wiedergegebenen Versuchen über die hämolytische Wirkung der Seife getan haben, den zeitlichen Verlauf der Hämolyse beobachtet. Wenn auch zum Schluß überall die Amboceptor-Komplement-Hämolyse eintritt, so ist doch ersichtlich, daß sie durch gewisse Seifenmengen erheblich verzögert wird.

Bei meinen Versuchen ist es mir nicht gelungen, bei Verwendung des oleinsauren Natrons, wohl aber anderer Seifen, diese antikomplementäre Wirkung als eine dauernde Erscheinung zu registrieren; deutliche Unterschiede ergaben sich aber entsprechend den Angaben von Sachs und Altmann immer bei zeitlicher Beobachtung.[1])

Ich stellte eine ganze Reihe gleichartiger Versuche an, die sich vollkommen an die Versuchsbedingungen von Sachs und Altmann anschließen.

Es wurden absteigende Mengen von oleinsaurem Natron (Kahlbaum) mit je 0,1 ccm aktiven Meerschweinchenserums als Komplement 1 Stunde bei 37° digeriert; sodann wurde 1 ccm 5%igen einmal gewaschenen Ziegenblutes und die 3fach lösende Dosis eines auf Ziegenblut wirkenden im Verhältnis 1:1000 verdünnten Ziegen-Kaninchen-Amboceptors zugesetzt. Gesamtvolumen 2,5 ccm. 2 Stunden Brutschrank von 37°, dann Eisschrank.

Tabelle V.

Versuch vom 8. V. 08.

Olein. Natr.	5′	15′	30′	45′	60′	90′	24 Std.
1. 0,2	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,15	fast „	„	„	„	„	„	„
3. 1,0 $^{1}/_{10}$	0	Spur	„	„	„	„	„
4. 0,8	0	0	gering	„	„	„	„
5. 0,6	0	0	0	mäßig	mäßig	„	„
6. 0,4	0	0	mäßig	f. kompl.	f. kompl.	„	„
7. 0,3	0	f. kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	„	„
8. 0,2	0 „	„	„	„	„	„	„

Es ist also eine komplementhemmende Wirkung der Seife nur bei Beobachtung des zeitlichen Ablaufes der Reaktion manifest und zwar bei einem Mengenverhältnis des oleinsauren Natrons von 0,6 $^{1}/_{10}$; nach 1 Stunde ist die Hämolyse erst mäßig, nach 90 Minuten schon komplett; die Differenzen sind am besten nach 15 Minuten langem Verweilen der Proben im Brutschrank zu beobachten.

Besonders klar ist bei diesem Versuch zu beobachten, wie nach 90 Minuten ein Zusammenfließen stattfindet, einerseits

---

[1]) Zur Orientierung möchte ich hier beifügen, daß ich als Komplementhemmung immer die komplementäre Wirkung der Seife allein gegenüber dem hämolytischen System, als Komplementbindung die antikomplementäre Wirkung der Seife in Gegenwart von syphilitischem Serum (bzw. gewisser nicht syphilitischer Sera) bezeichne.

der Seifenhämolyse, andererseits der Amboceptor-Komplementhämolyse.

Trotz der häufigen Wiederholung des Versuches war es nicht möglich, eine **dauernde** Hemmung der Komplementwirkung durch die Seife zu erzielen; eine Änderung insofern, daß statt Ziegenblut und Ziegen-Kaninchen-Amboceptor Hammelblut und Hammel-Kaninchen-Amboceptor, sowie Hammelblut und Ziegen-Kaninchen-Aboceptor, der bekanntlich auch auf Hammelblutkörperchen einwirkt, genommen wurde, übte keinen Einfluß auf das schließliche Resultat aus.[1])

Tabelle VI und VII.

Versuche vom 9. 5. 08.

Versuch der Hemmung der Komplementwirkung bei Verwendung von Hammelblutkörperchen und Hammel-Kaninchen-Amboceptor.

Olein. Natr.	5′	15′	30′	45′	60′	24 Std.
1. 0,2	f. kompl.	f. kompl.	f. kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,15	sehr stark	„ „	„ „	„	„	„
3. 1,0 $^1/_{10}$	0	0	sehr stark	„	„	„
4. 0,8	„	„	„ „	„	„	„
5. 0,6	„	„	„ „	f. „	„	„
6. 0,4	„	kompl.	kompl.	kompl.	„	„
7. 0,3	gering	„	„	„	„	„
8. 0,2	mäßig	„	„	„	„	„

Versuch der Hemmung der Komplementwirkung bei Verwendung von Hammelblutkörperchen und Ziegen-Kaninchen-Amboceptor.

Olein Natr.	20′	45′	24 Std.
1. 0,15	komplett	komplett	komplett
2. 0,1	fast „	„	„
3. 0,05	0	stark	„
4. 0	stark	komplett	„

Nachdem so das Verhalten des oleinsauren Natrons nach den verschiedenen Richtungen hin in der erforderlichen Weise untersucht war, konnten die eigentlichen Komplementbindungsversuche angestellt werden. Ich will gleich von vornherein

[1]) Da die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen war, daß die komplementhemmende resp. komplementbindende Wirkung der Seifenlösung nicht auf das oleinsaure Natron zurückzuführen sei, sondern vielleicht eine Funktion der geringen Menge unlöslicher Magnesia-Seife ist, die bei der Reaktion des oleinsauren Natrons mit der stets Spuren von Magnesium enthaltenden Kochsalzlösung entsteht, wurden die entsprechenden Versuche auch mit oleinsaurem Natron angestellt, welches in einer 0,85$^0/_0$igen Lösung reinsten Chlornatriums (pro analysi Merck) gelöst war. Das Resultat änderte sich jedoch dadurch in keiner Weise.

bemerken, daß unsere Resultate insofern weniger günstige waren als die von Sachs und Altmann, als es nur in einem einzigen Falle gelang, eine dauernde Hinderung der Hämolyse durch oleinsaures Natron und syphilitisches Serum zu erzielen. Es können hier außerordentlich kleine Differenzen sowohl in der Beschaffenheit des Materials wie in der Versuchsanordnung eine entscheidende Rolle spielen, wie überhaupt für die theoretische Bearbeitung der Reaktion die Versuchsbedingungen durchaus noch ungenügend bekannt sind. Wie wenig man berechtigt ist, Differenzen in den Versuchsergebnissen verschiedener Autoren voreilig in irgend einer Richtung zu deuten, ergibt sich aus den neuesten interessanten Mitteilungen von Sachs und Rondoni[1]). Diese Autoren konnten feststellen, daß die Ablenkungsfähigkeit der alkoholischen Extrakte syphilitischer Lebern sich durchaus verschieden verhält, je nach dem Modus, nach welchem die Verdünnung der Extrakte mit Kochsalzlösung vorgenommen wird. Während Verdünnungen, welche durch langsames Zutröpfeln des alkoholischen Extraktes zur Kochsalzlösung erhalten werden, eine starke Ablenkungsfähigkeit zeigen, kann dieselbe bei solchen Verdünnungen, bei denen man den alkoholischen Extrakt rasch zur Kochsalzlösung zufügt, vollständig fehlen oder sehr verringert sein. Beide Verdünnungen, die in bezug auf ihre Zusammensetzung vollständig gleich sind, unterscheiden sich auch äußerlich dadurch, daß die erstere getrübt, die letztere klarer ist. Nach mündlicher Mitteilung von Professor Morgenroth und Dr. Halberstädter konnten auch sie diese Erfahrungen bestätigen. Es wird noch vieler weiterer Untersuchungen bedürfen, bis ein absolut einheitliches Arbeiten verschiedener Untersucher gesichert ist.

Bei Verwendung des oleinsauren Natrons (Kahlbaum) erhielt ich in zahlreichen Versuchen mit einer Anzahl syphilitischer Sera Resultate, die den in folgenden Protokollen enthaltenen entsprechen.

Fallende Mengen der 1%igen Lösung des oleinsauren Natrons wurden mit 0,1 ccm aktiven Meerschweinchenserums als Komplement und 0,1 ccm des zu untersuchenden durch ½stündiges Erhitzen auf 55° inaktivierten menschlichen Serums 1 Stunde lang bei 37° digeriert; dann wurde die 3fach lösende Dosis eines Ziegen-Kaninchen-Amboceptors und je 1 ccm 5%igen gewaschenen Ziegenblutes zugesetzt.

---

[1]) Sachs und Rondoni, Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 44.

Tabelle VIII und IX.

Versuche vom 10. V. 08.

Olein. Natr.	5′	15′	20′	30′	24 Std.
1. 0,25	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,2	"	"	"	"	"
3. 0,15	0	"	"	"	"
4. 0,1	0	0	sehr stark	"	"
5. 0,05	0	0	stark	stark	"
6. 0	fast kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	"

Olein. Natr.	20′	40′	24 Std.
1. 0,25	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,2	0	"	"
3. 0,15	0	0	"
4. 0,1	0	fast kompl.	"
5. 0	kompl.	kompl.	"

Die hier untersuchten Sera waren bei der mit Luesleberextrakt erfolgten Komplementbindung stark positiv.

Bei den verschiedenen Untersuchungen zeigen sich wohl Unterschiede insofern, als zwar meist bei 0,15 der 1%igen Lösung des oleinsauren Natrons, aber immer zu ganz verschiedenen Zeiten die zwischen 20 und 60 Minuten variieren, die Komplementbindung manifest wird, der aber spätestens immer nach 2 Stunden die komplette Lösung des Blutes folgt.

Zeitlich betrachtet hat eine beträchtliche Hinderung der Komplementfunktion statt, die bei einer Menge des oleinsauren Natrons erfolgt, welche beträchtlich größer, meist $2^1/_2$ mal so groß ist wie die zur einfachen Komplementhemmung notwendige.

Bei dem oleinsauren Natron spielt also, wie schon Sachs und Altmann angeben, die komplementhemmende Wirkung in den Versuchen zur Komplementbindung keine störende Rolle; denn die nötigen Seifenkonzentrationen sind ganz verschieden.

Dieselbe Versuchsanordnung, nur mit dem Unterschied, daß für Ziegenblut und Ziegen-Kaninchen-Amboceptor, Hammelblut- und Hammel-Kaninchen-Amboceptor verwandt wurden, ergab vollkommen identische Resultate.

Tabelle X.

Versuch vom 10. V. 08.

Olein. Natr.	20′	40′	24 Std.
1. 0,25	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,2	"	"	"
3. 0,15	0	0	"
4. 0,1	0	kompl.	"
5. 0	kompl.	kompl.	"

Eine erheblichere Hemmung als hier beschrieben, konnte ich nur in einem Fall beobachten, in welchem das oleinsaure Natron von Merck zugleich mit einem syphilitischen Serum, welches mit Leberextrakt starke Ablenkung ergab, verwandt wurde.

Die Versuchsanordnung entspricht den früher mitgeteilten.

Tabelle XI.

Versuch vom 5. 6. 08.

Olein. Natr. (Merck)	5′	15′	25′	45′	60′	75′	24 Std.
1. 0,25	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,2	„	„	„	„	„	„	„
3. 0,15	0	wenig	„	„	„	„	„
4. 1,0 $^1/_{10}$	0	0	0	0	Spur	Spur	wenig
5. 0,8	0	0	mäßig	mäßig	mäßig	stark	sehr stark
6. 0,6	0	wenig	stark	f. kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
7. 0,4	0	„	„	„ „	„	„	„
8. 0,2	0	„	„	kompl.	„	„	„
9. 0	stark	f. kompl.	kompl.	„	„	„	„

Hier trat also bei 1,0 ccm der $^1/_{10}$-Verdünnung der Seife dauernd das Phänomen der antikomplementären Wirkung in Erscheinung, das sonst bei 0,15 der $1\,^0/_0$igen Kahlbaumschen Seife nur zeitlich zu beobachten war.

Die hier gebrauchte $1\,^0/_0$ige Lösung des oleinsauren Natrons war durch Erwärmen auf 90° hergestellt. Bei Verwendung von in der Kälte gelöstem oleinsaurem Natron fand die dauernde Hemmung in diesem Fall bei 0,9 der $^1/_{10}$-Verdünnung der Seifenlösung statt. Es scheint also die Art der Lösung einen gewissen Einfluß auf die Ablenkung auszuüben.

Es ist bekannt, daß schon im normalen menschlichen Blutserum Seifen vorhanden sind, und zwar in einer Menge, die allein schon Hämolyse erzeugen würde, würde diese nicht durch die im Blutserum vorhandenen Eiweißstoffe verhindert. Man kann ähnliche Verhältnisse künstlich im Reagensglase schaffen und dann mit diesem Seifen-Serum-Gemisch an die Prüfung menschlicher luetischer und nicht luetischer Sera herangehen, wobei dann die Hämolyse durch Seife fortfallen würde und allein die Amboceptor-Komplementhämolyse in Aktion treten könnte. Versuche, die in dieser Richtung angestellt wurden, ergaben, daß dann auch die Komplementbindung durch Seife ausbleibt.

Entsprechend den früher gefundenen Daten, daß die Grenzzone der Hemmung der reinen Seifenhämolyse durch 0,1 ccm inaktivierten Meerschweinchenserums bei 0,4 der $^1/_{10}$-Verdünnung des oleinsauren Natrons liegt, wurden folgende Gemische hergestellt:

I. 1,0 ccm inakt. Meerschw.-Ser. + 3,0 $^1/_{10}$ Natron olein.
II. 1,0 „ „ „ + 4,0 „ „
III. 1,0 „ „ „ + 5,0 „ „
IV. 1,0 „ „ „ + 3,0 physiologischer Kochsalzlösung
V. 1,0 „ 0,85 %ige Kochsalzlösg. 3,0 + $^1/_{10}$ Natron olein.

Diese Gemische wurden 1 Stunde lang bei 37° im Brutschrank digeriert.

Es wurde dann folgendermaßen verfahren: Fallende Mengen dieser Gemische in größeren Intervallen (in der Regel so, daß ungefähr eine Konzentration der Seife erreicht wurde, die sich um 0,6 der $^1/_{10}$-Verdünnung des oleinsauren Natrons bewegte) wurden mit 0,1 ccm aktiven Meerschweinchenserums als Komplement und 0,1 ccm durch Erhitzen auf 55° inaktivierten Menschenserums von Luetischen und Nichtluetischen bzw. mit Luesleberextrakt ablenkendem und nicht ablenkendem menschlichen Serum eine halbe Stunde bei 37° digeriert; dann erfolgte Zusatz von entsprechendem Amboceptor (ca. 3fach lösende Dosis) und je 1 ccm 5 %igen Ziegenblutes.

Es zeigte sich, daß die antikomplementäre Wirkung der Seife bzw. des Seifen-Serum-Gemisches vollkommen unterblieb, wenn die hämolytische Wirkung der Seife durch Serum aufgehoben war.

Als ungeeignet erwies sich das oleinsaure Kali (Kahlbaum), mit dem schon nach 8 Minuten in unserer Versuchsanordnung in allen Röhrchen komplette Hämolyse eintrat; es ist anzunehmen, daß die Seifenhämolyse hier sehr im Vordergrund steht, da Amboceptor-Komplement nicht imstande sind, Blut in so kurzer Zeit zu lösen.

Eigenartige Resultate lieferten dann die Versuche mit den übrigen noch verwandten Seifen: palmitinsaures Natron und stearinsaures Kali.

Zunächst war festzustellen, ob die von Sachs und Altmann für das oleinsaure Natron beschriebene Komplementhemmung (ohne luetisches Serum) auch beim palmitinsauren

Natron resp. stearinsauren Kali als dauernde Erscheinung zu beobachten sei.

Die Versuchsanordnung war die oben geschilderte:

Fallende Mengen des Kahlbaumschen palmitinsauren Natrons, in physiologischer Kochsalzlösung zu 1 % gelöst, wurden mit 0,1 ccm aktiven Meerschweinchenserums 1 Stunde bei 37° digeriert; dann erfolgte Zusatz der 3fach lösenden Dosis der entsprechenden Amboceptormenge und 1 ccm 5 %igen Ziegenblutes. Der auch zeitlich beobachtete Verlauf dieses Versuches war folgendermaßen:

Tabelle XII.

Versuch vom 11. VI. 08.

Palmitinsaures Natron	10′	20′	30′	45′	24 Std.
1. 1,0	stark	stark	kompl.	kompl.	komplett
2. 0,8	„	sehr stark	„	„	„
3. 0,6	„	f. kompl.	f. „	„	„
4. 0,3	„	sehr stark	„ „	„	„
5. 1,0 $^1/_{10}$	0	0	0	0	„
6. 0,8	0	0	0	0	„
7. 0,6	0	0	0	0	Spur
8. 0,3	f. kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	komplett
9. 0,1	„	„	„	„	„

Es ist also auch beim palmitinsauren Natron das Phänomen der Komplementhemmung sehr deutlich ausgeprägt, ein Befund, der regelmäßig zu konstatieren war, wenn nur Rücksicht auf ein besonderes, weiter unten beschriebenes Verhalten des palmitinsauren Natrons genommen wurde.

Zu erkennen ist auch hier wieder das Zusammenfließen der Seifenhämolyse und der Amboceptor-Komplementhämolyse. Als Vorteil gegenüber dem oleinsauren Natron ist hervorzuheben, daß die Seifenkonzentration, bei der die Komplementhemmung dauernd in Erscheinung tritt, sehr nahe der einfach lösenden Dosis des palmitinsauren Natrons für Ziegenblut liegt, daß also die Seifenhämolyse bei der Konzentration von 0,6 $^1/_{10}$, da ja noch die Serumhemmung hinzukommt, gar keine Rolle spielt.

Da es noch keineswegs feststeht, welchem Bestandteil der Seifenlösung, ob der Seife selbst oder vielleicht einer geringfügigen löslichen Verunreinigung die Eigenschaft der Komplementbindung zukommt, filtrierte ich das ausgefallene palmitinsaure Natron und auch das stearinsaure Kali durch ein Baryt-

filter ab und benutzte das Filtrat. Dieses zeigte aber die Eigenschaften gewöhnlicher Kochsalzlösung und ergab keine Komplementhemmung.

Um die Lösungen des palmitinsauren Natrons öfter verwenden zu können, mußten dieselben stets von neuem verflüssigt werden; es kam häufig vor, daß ein und dasselbe palmitinsaure Natron hintereinander und in Zwischenräumen von Tagen immer und immer wieder auf ca. 98° erhitzt werden mußte; hierbei fiel mir ein eigenartiges Verhalten auf, das ich hier kurz mitteilen möchte.

Bei den mit frisch bereitetem palmitinsauren Natron angestellten Versuchen, die antikomplementäre, also die hemmende Wirkung festzustellen, erzielte ich stets ein positives Resultat. Bei später angestellten Untersuchungen, die als Kontrolle zu Komplementbindungsversuchen dienen sollten, stellte sich nun die merkwürdige Tatsache heraus. daß bei der Seifenkonzentration, bei der die antikomplementäre Eigenschaft voll sich zeigen sollte, geringe, ja komplette Hämolyse eintrat. Als einziger Unterschied, der bei den unter ganz gleichen Bedingungen angestellten Versuchen ev. zu berücksichtigen war, konnte nur die zur Verflüssigung der Seife öfters erfolgte Erhitzung in Betracht kommen. Ich stellte dementsprechende methodische Versuche an, die das Ergebnis hatten, daß häufig erhitztes palmitinsaures Natron seine antikomplementäre Fähigkeit vermindert, sehr oft erhitztes palmitinsaures Natron diese Fähigkeit ganz verlieren kann.

In diesen Versuchen wurde so verfahren, daß im Verlauf von ca. 2 Stunden die Seifenlösung in einem kochenden Wasserbad (öfter zur Verflüssigung und durch sofortiges Abkühlen mit kaltem Wasser zur Erstarrung gebracht wurde.

Tabelle XIII.

Versuch vom 18. VI. 08.

A.	I.	Palmitinsaures Natron (Kahlbaum)	1%	2mal erhitzt
	II.	" " "	"	3 " "
	III.	" " "	"	4 " "
	IV.	" " "	"	8 " "
	V.	" " "	"	16 " "
B.		Meerschweinchenserum (Komplement)	0,1,	
C.		Ziegen-Kaninchen-Amboceptor	0,2 1/100,	
D.		Ziegenblut	1,0,	

A B 1 Stunde 37°, dann das übrige auf 2,5 ccm aufgefüllt.

Palmitinsaures Natron	15′	30′	45′	60′	90′	120′	24 Std.
I.							
1. 0,2	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,15	wenig	„	„	„	„	„	„
3. 1,0 1/10	0	stark	„	„	„	„	„
4. 0,8	0	0	0	f. „	„	„	„
5. 0,6	0	0	0	0	0	0	Spur (Kuppe)
6. 0,5	0	0	0	0	0	0	0 bis Spur (Kuppe)
II.							
1. 0,2	mäßig	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,15	0	0	0	stark	„	„	„
3. 1,0 1/10	0	0	0	„	„	„	„
4. 0,8	0	0	0	0	wenig	„	„
5. 0,6	Spur	Spur	Spur	Spur	„	wenig	wenig
6. 0,5	wenig	mäßig	stark	f. kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
III.							
1. 0,2	stark	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,15	0	0	0	0	„	„	„
3. 1,0 1/10	0	0	wenig	wenig	„	„	„
4. 0,8	0	0	0	0	„	„	„
5. 0,6	0	0	0	0	0	0	0 bis Spur (Kuppe)
6. 0,5	0	0	0	0	0	0	0 bis Spur (Kuppe)
IV.							
1. 0,2	f. kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,15	0	0	0	0	stark	„	„
3. 1,0 1/10	0	0	0	0	mäßig	f. „	„
4. 0,8	0	0	0	0	0	wenig	„
5. 0,6	0	0	0	0	0	0	0 bis Spur (Kuppe)
6. 0,5	0	0	0	0	0	0	0 bis Spur (Kuppe)
V.							
1. 0,2	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,15	wenig	stark	„	„	„	„	„
3. 1,0 1/10	0	„	„	„	„	„	„
4. 0,8	0	sehr „	„	„	„	„	„
5. 0,6	0	0	stark	„	„	„	„
6. 0,5	0	0	0	0	f. „	„	„

Es wäre denkbar, daß bei dem häufigen Erhitzen im gewöhnlichen Reagensglas Alkali oder auch Silicate aus dem Glas in die Seife übertreten; um diese Fehlerquellen auszuschließen, stellte ich dieselben Versuche in Jenaer Glas an, die entsprechende Resultate ergaben. Auch Erhitzen in größeren Zwischenräumen mit langsamer Abkühlung hatte dasselbe Resultat.

Ich möchte nun die Ergebnisse der mit palmitinsaurem Natron angestellten Komplementbindungsversuche mitteilen.

Die Versuchsanordnung war entsprechend der früher bei Anwendung von Leberextrakt und ölsaurem Natron geschilderten: Fallende Mengen einer Lösung von palmitinsaurem Natron in 0,85 $^0/_0$ iger Kochsalzlösung, die immer frisch bereitet wurde, wurden mit 0,1 ccm des durch halbstündiges Erwärmen auf 55° inaktivierten menschlichen Serums und 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement versetzt und 1 Stunde lang bei 37° im Brutschrank belassen; dann erfolgte Zusatz der 3fach lösenden Dosis des Ziegen-Kaninchen-Amboceptors und von je 1 ccm 5 $^0/_0$ igen Ziegenblutes.

Der zeitliche Verlauf der ersten Versuche wurde in größeren Zwischenräumen registriert.

Tabelle XIV.

Versuch vom 13. VI. 08.

Palmitinsaures Natron	15′	30′	24 Std.
1. 0,3	stark	komplett	komplett
2. 0,2	wenig	wenig	mäßig
3. 0,15	0	0	0 bis Spur
4. 1,0 $^1/_{10}$	0	0	0
5. 0,8	0	0	wenig
6. 0,6	Spur	Spur	fast komplett
7. 0,5	gering	stark	komplett
8. 0,4	stark	fast komplett	„
9. 0,2	„	„ „	„

Es ergibt sich aus diesem Versuch, daß auch mit palmitinsaurem Natron eine Komplementbindung bei Anwendung von luetischem Serum zu erzielen ist. Der positive Ausgang dieses und einer Anzahl analoger Versuche ist deshalb von Interesse, weil die mit der unbekannten Substanz des luetischen Serums reagierende bekannte Verbindung bei der in Betracht kommenden Temperatur praktisch unlöslich ist.

Das palmitinsaure Natron bildet in den angewandten Verdünnungen einen feinflockigen Niederschlag. Wenn man in Analogie mit denjenigen Komplementbindungsvorgängen, welche den Ausgangspunkt für die Wassermannsche Reaktion bildeten, der Annahme zuneigt, daß als Bedingung der Komplementbindung eine gegenseitige Beeinflussung der reagierenden Substanzen stattfindet, muß man voraussetzen, daß entweder die reagierende Substanz des luetischen Serums durch das palmitinsaure Natron ihrer Lösung entzogen wird, oder daß umgekehrt die zur Reaktion nötigen Mengen der Seife in Lösung gebracht

werden. Es sind dies Fragen, deren experimentelle Bearbeitung im Gange ist.

Auffallend erscheinen die quantitativen Verhältnisse, die diesem Versuch der Komplementbindung zugrunde liegen.

Bei 1,0 $^1/_{10}$ der Seifenlösung findet eine vollständige Bindung des Komplements statt, während bei 0,6 $^1/_{10}$ fast komplette Lösung eintritt. Nun sehen wir aus früheren Versuchen (Tabelle XII), daß die komplementhemmende Wirkung des palmitinsauren Natrons bei einer Menge zutage tritt, die ungefähr die Hälfte des für die Bindung geltenden Optimums darstellt. Im Bindungsversuch genügt diese Menge — 0,6 $^1/_{10}$ — nicht im entferntesten. Es findet also in der Weise eine Verschiebung statt, daß die Komplementhemmung unterdrückt wird und an ihre Stelle das neue Phänomen der Komplementbindung tritt. Bliebe die Komplementhemmung auch bei Anwendung von luetischem Serum erhalten, so würde sie die Komplementbindung vollständig verdecken. Entsprechende Resultate haben auch Sachs und Altmann bei Anwendung von oleinsaurem Natron beschrieben.

Ich lasse noch einen weiteren Versuch folgen, bei dem die komplementbindende Fähigkeit des luetischen Serums, die auch bei dem Kontrollversuch mit Organextrakt besonders stark hervortritt, außerordentlich mächtig ist, so daß die Seifenmenge, welche im Komplementbindungsversuch wirksam ist, noch zusammenfällt mit der für gewöhnlich komplementhemmenden Seifenmenge.

Die richtige Deutung der Erscheinungen als auf Komplementbindung beruhend, ergibt sich aus Vergleichung mit weniger wirksamen luetischen Seris und aus der regelmäßig gemachten Beobachtung, daß die Komplementhemmung durch das menschliche Serum aufgehoben wird.

Die Versuchsanordnung ist entsprechend der bei Tabelle XIV mitgeteilten. Zur Verwendung kam Serum des luetischen We.

Tabelle XV.

Versuch vom 17. VI. 08.

Palmitinsaures Natron	15′	30′	60′	90′	120′	24 Std.
1. 0,2	fast kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,15	0	0	0	0	mäßig	mäßig
3. 1,0 $^1/_{10}$	0	0	0	0	0	0 bis Spur (Kuppe)

Palmitinsaures Natron	15′	30′	60′	90′	120′	24 Std.
4. 0,9	0	0	0	0	0	0
5. 0,6	0	0	0	0	0	Spürchen (Kuppe)
6. 0,5	0	0	0	0	0	Spur (diffus)
7. 0,4	0	0	0	0	0	gering

Daß hier nicht etwa eine Verschiebung der komplementhemmenden Wirkung stattfindet, sondern daß die komplementhemmende und komplementbindende Wirkung des palmitinsauren Natrons unabhängig voneinander sind, ergab sich aus Versuchen, welche mit der üblichen 1 %igen Emulsion von palmitinsaurem Natron angestellt wurden, die aber mehrfach schon zu Versuchen benutzt worden und jedesmal, um zur Bereitung der Verdünnungen die Seife in Lösung zu bringen, aufgekocht worden war. Hier trat eine Veränderung der Lösung ein, die sich zunächst darin aussprach, daß die komplementhemmende Wirkung nicht mehr oder nur noch andeutungsweise eintrat.

Es ergibt sich dies aus der folgenden Tabelle.

Tabelle XVI.

Versuch vom 17. VI. 08.

Palmitinsaures Natron	10′	20′	45′	60′	120′	24 Std.
1. 0,3	0	sehr stark	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,2	0	mäßig	„	„	„	„
3. 0,15	0	gering	gering	gering	„	„
4. 1,0 $^1/_{10}$	0	0	0	Spur	„	„
5. 0,8	0	0	0	0	„	„
6. 0,6	0	0	0	0	„	„
7. 0,5	0	0	0	0	Spur	fast kompl.
8. 0,3	fast kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.

Nur 0,5 $^1/_{10}$ ergibt eine ganz geringfügige komplementhemmende Wirkung, während bei unveränderten Seifenlösungen 0,6 $^1/_{10}$ vollständige Komplementhemmung veranlaßt.

Der gleichzeitig angestellte Versuch mit dem luetischen Serum zeigte, daß die komplementbindende Funktion der Seifenlösung sich in nichts verändert hat; das Ergebnis des Versuches ist etwa das gleiche wie bei dem unter Tabelle XIV beschriebenen Komplementbindungsversuch, der mit einer Lösung von palmitinsaurem Natron von vollständig intakter komplementhemmender Wirkung angestellt ist.

Tabelle XVII.

Versuch vom 16. VI. 08.

Zur Verwendung kam luetisches Serum Bo. Ch.

Palmitinsaures Natron	10′	30′	45′	60′	120′	24 Std.
1. 0,3	0	Spur	sehr stark	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,2	0	„	Spur	gering	„	„
3. 0,15	0	„	„	Spur	Spur	gering
4. 1,0 $^1/_{10}$	0	0	0	0	0	Spur
5. 0,8	0	0	0	0	0	„
6. 0,6	0	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
7. 0,5	stark	„	„	„	„	„
8. 0,3	sehr stark	„	„	„	„	„

Mit 1,0 $^1/_{10}$ und 0,8 $^1/_{10}$ der Seifenlösung tritt fast vollständige Komplementbindung ein.

Zufügen möchte ich hier, daß bei einem zu diesem Versuch als Kontrolle verwandten menschlichen Serum, welches mit Organextrakt eine Komplementbindung nicht ergab, nur mit der größten verwandten Seifenmenge — nämlich 0,3 der 1 % igen Lösung — eine fast vollständige Aufhebung der Hämolyse eintrat. Ein derartiges Verhalten wurde öfter beobachtet. Es muß aber bemerkt werden, daß hier sicherlich zum Teil Sera von Luetischen im Latenzstadium oder nach Absolvierung einer Quecksilberkur zur Verwendung kamen. Das folgende Protokoll zeigte den Verlauf dieses Versuches.

Tabelle XVIII.

Versuch vom 16. VI. 08.

Palmitinsaures Natron	10′	30′	60′	90′	120′	24 Std.
1. 0,3	0	0	0	0	0	Spürchen
2. 0,2	fast kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
3. 0,15	„	„	„	„	„	„
4. 1,0 $^1/_{10}$	0	0	0	0	sehr stark	„
5. 0,8	0	sehr stark	f. kompl.	kompl.	kompl.	„
6. 0,6	stark	f. komplett	kompl.	„	„	„
7. 0,5	f. kompl.	wohl kompl.	„	„	„	„
8. 0,3	„ „	kompl.	„	„	„	„

Bei den zahlreichen Versuchen mit den Seris von Erwachsenen, deren Verhalten stets durch den typischen Versuch mit durchaus geeignetem alkoholischen Extrakt aus den Lebern luetischer Neugeborener kontrolliert wurde, ergab sich eine gute Übereinstimmung der Resultate.

Eine Ausnahme bildeten drei Sera Bi., He. und Wo. des im folgenden in extenso mitgeteilten Versuches. Hier handelt es sich um Sera von drei Personen, die mit Leberextrakt negativ reagierten; auch klinisch bestanden nach Mitteilung von Herrn Professor Bruhns keinerlei Anhaltspunkte für Lues.

Wie aus dem folgenden Protokoll ersichtlich ist, geben diese Sera mit palmitinsaurem Natron ein typisches Komplementbindungsphänomen, bei dem nur das Optimum der Seife gegenüber drei gleichzeitig geprüften, von Luetischen stammenden Seris etwas nach unten verschoben ist.

Das gleichzeitig mitgeprüfte, auch eine negative Wassermannsche Reaktion ergebende normale Serum Gro. zeigte keine Komplementbindung, wohl aber das oben angeführte Hemmungsphänomen mit großen Seifenmengen.

Ich teile hier nur das nach 24^h registrierte Verhalten von drei dieser eben erwähnten vier Normalsera mit.

Tabelle XIX.

Versuch vom 13. VII. 08.

Palmitinsaures Natron	Serum Gro.	Serum Bi.	Serum He.
1. 0,5	gering-mäßig	komplett	wohl komplett
2. 0,4	komplett	„	komplett
3. 0,3	„	„	„
4. 0,2	„	„	„
5. 0,15	„	„	„
6. 1,0 $^1/_{10}$	„	0	0
7. 0,8	„	gering	komplett
8. 0,6	„	stark	„

Besonders auffallend erschien in dieser Hinsicht das Verhalten von vier Sera normaler Neugeborener, die ich untersuchte, nachdem anscheinend normales Serum Erwachsener bei Verwendung von Seifen bei der Reaktion solche verschiedene Resultate ergab. Das Blut war aus dem mütterlichen Ende der Nabelschnur gewonnen; die Prüfung des Serums mit Leberextrakt ergab keine Komplementbindung.

Dagegen gaben alle vier Sera bei der Prüfung mit palmitinsaurem Natron — ebenso mit stearinsaurem Kali — typische Komplementbindung bei einer Seifenmenge von 0,8 $^1/_{10}$. Auch hier tritt wie bei den oben angeführten Seris die Verschiebung des Seifenoptimums nach unten hervor, wie die folgende Tabelle zeigt, aus der das nach 24^h abgelesene Resultat zu ersehen ist.

Die Versuchsanordnung ist die bekannte, schon mehrfach mitgeteilte.

Tabelle XX.

Versuch vom 15. VII. 08.

Palmitinsaures Natron	
1. 0,3	komplett
2. 0,2	„
3. 0,15	„
4. 1,0 $^1/_{10}$	fast komplett
5. 0,8	0 bis Spürchen (Kuppe)
6. 0,6	komplett

Schlüsse theoretischer Natur sind aus diesen Divergenzen bis auf weiteres nicht zu ziehen.

Wir wissen durch Sachs und Altmann, Harald Boas[1]) und auch durch noch nicht veröffentlichte entsprechende Beobachtungen von Morgenroth und Halberstädter, daß auch im normalen Serum, wenn dasselbe nicht auf 55° erwärmt war, Faktoren auftreten können, welche das Phänomen der Komplementbindung veranlassen. Welche Umstände für die größere oder geringere Empfindlichkeit der Reaktion maßgebend sind, darüber sind wir bei weitem noch nicht genügend unterrichtet, und es ist deshalb möglich, daß hier Reste der wirksamen Substanz des normalen Serums, die bei der für die Diagnostik üblichen Versuchsanordnung ausgeschaltet werden, sich noch wirksam zeigen.

Jedenfalls lassen es diese Befunde wünschenswert erscheinen, daß man ohne zwingenden Grund an der Methodik der Wassermannschen Reaktion, wie sie sich jetzt in tausendfältiger klinischer Erfahrung bewährt hat, möglichst wenig ändert.

Hieran anschließend möchte ich noch über einen Befund bezüglich der komplementbindenden Fähigkeit von normalem Kaninchenserum berichten.

Morgenroth und Halberstädter haben in noch nicht veröffentlichten Versuchen beobachtet, daß normale Kaninchensera, welche im aktiven Zustand keine Komplementbindung mit Luesleberextrakt ergeben, nach halbstündigem Erwärmen auf 55° das Phänomen in ausgeprägtem Maße zeigen. Bei einem Kaninchenserum, welches mit Luesleberextrakt geprüft, sowohl

[1]) Harald Boas, Berl. klin. Wochenschr. 1909, Nr. 9.

im aktiven wie inaktiven Zustand positive Reaktion gab, beobachtete ich bei Versuchen mit palmitinsaurem Natron, daß nur das inaktive Serum die Reaktion zeigte, wie aus dem folgenden Versuchsprotokoll hervorgeht. Es ist möglich, daß bei diesem Ergebnis das dem Kaninchenserum eigne Komplement, welches durch das Erwärmen zerstört wird, eine Rolle spielt.

Tabelle XXI.

Versuch vom 22. VII. 08.

Palmitinsaures Natron	Kaninchenserum G aktiv; 0,1 ccm	Kaninchen-Serum G inaktiv; 0,1 ccm
1. 0,2	wohl komplett	mäßig
2. 0,15	„ „	Spürchen (Kuppe)
3. 1,0 $^1/_{10}$	komplett	wohl komplett
4. 0,8	„	komplett
5. 0.6	„	„
6. 0,5	„	„

Analoge Versuche, die ganz in derselben Weise wie mit palmitinsaurem Natron mit stearinsaurem Kali angestellt wurden, ergaben dieselben Resultate.

Wie die folgenden Versuchsbeispiele ersehen lassen, sind die Erscheinungen der Komplementhemmung wie Komplementbindung bei beiden Seifen annähernd die gleichen.

Tabelle XXII (Komplementbindung.)

Versuchsanordnung wie gewöhnlich.

Versuch vom 18. VII. 08.

a) Verwendung von Serum Ge., das eine positive Wassermannsche Reaktion ergab.

Stearinsaures Kali	15′	45′	90′	120′	24 Std.
1. 0.3	fast kompl.	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
2. 0,2	0	Spur	sehr stark	wohl kompl.	„
3. 0,15	0	0	0	0	0 bis Spürchen (Kuppe)
4. 1,0 $^1/_{10}$	0	0	0	0	0
5. 0,8	0	0	0	0	Spur (diffus)
6. 0,6	0	Spur	Spur	Spur	gering
7. 0,5	gering	gering	gering	mäßig	mäßig
8. 0,3	„	mäßig	mäßig	„	„

b) Verwendung von Serum Op., das eine negative Wassermannsche Reaktion ergab (Lues wahrscheinlich).

Stearinsaures Kali	15′	45′	90′	120′	24 Std.
1. 0,3	0	0	0	kompl.	kompl.
2. 0,2	0	0	0	stark	fast kompl.
3. 0,15	0	0	0	0	Spur
4. 1,0 $^{1}/_{10}$	0	Spur	Spur	gering	gering
5. 0,8	gering	kompl.	kompl.	kompl.	kompl.
6. 0,6	fast kompl.	„	„	„	„
7. 0,5	„ „	„	„	„	„
8. 0,3	„ „	„	„	„	„

Auch mit Kaninchenserum wurden Resultate erzielt, ähnlich den oben bei Verwendung von palmitinsaurem Natron beschriebenen.

Über einige Versuche zum Abbaue der Cholsäure. I.

Über die Einwirkung der Kalischmelze auf Biliansäure.

Von

Otto von Fürth und Ernst Jerusalem, Wien.

(Eingegangen am 17. Juli 1909.)

Die im folgenden mitgeteilten Versuche wurden ausgeführt, um festzustellen, ob ein tiefgehender Abbau des Cholsäurekomplexes auf dem Wege der Einwirkung der Kalischmelze bewerkstelligt werden könne oder ob das Gefüge des Cholsäuremoleküles ein so festes sei, daß es auch diesem mächtigen Agens, welches minder resistente Atomverbände mit Leichtigkeit zerstört, Widerstand zu leisten vermag.

Wir glaubten eine Sprengung des wahrscheinlich aus einem komplizierten Ringsystem bestehenden Cholsäuremoleküles, insoweit eine solche überhaupt möglich sein sollte, vielleicht leichter bewerkstelligen zu können, wenn wir anstatt der Cholsäure $C_{20}H_{31}\begin{cases} CH.OH \\ CH_2.OH \\ CH_2.OH \\ COOH \end{cases}$ als solcher, eines ihrer Oxydationsprodukte, und zwar die Biliansäure $C_{19}H_{31}\begin{cases} CO \\ CO \\ COOH \\ COOH \\ COOH \end{cases}$ zum Ausgangspunkte unserer Versuch wählten.

Über die Natur der in der Biliansäure enthaltenen Ketongruppen ist nun allerdings nichts Näheres bekannt; nicht einmal so viel, ob sie Ringsystemen oder aliphatischen Ketten eingefügt sind. Immerhin erschien es nicht ausgeschlossen, daß die Ketongruppen vielleicht einem Locus minoris resistentiae

entsprechen und die Sprengung dieses so widerstandsfähigen Atomverbandes vermitteln könnten.

Zur Bereitung des Ausgangsmaterials wurde zunächst eine größere Menge krystallisierter Cholsäure aus frischer Rindergalle nach dem Vorgange von Bondi und Müller[1]) dargestellt und diese sodann unter genauer Befolgung der Vorschriften von Lassar-Cohn[2]) in Biliansäure übergeführt.

Dieselbe wurde einerseits aus Alkohol, andrerseits aus Eisessig umkrystallisiert und so in Form schneeweißer Krystalle vom Sp. 268 bis 273° gewonnen.

Zum Zwecke einer sicheren Identifizierung wurde aus einer Portion der Substanz das Oxim nach dem Vorgange Pregls[3]) dargestellt und analysiert:

0,1199 g Substanz gaben 0,2655 g CO_2 entspr. 60,38 °/₀ C
0,0785 g H_2O „ 7,25 °/₀ H
0,1650 g „ „ 7,9 ccm N (15°, 730 mm) entspr. 5,35 °/₀ N

	gefunden	berechnet für $C_{24}H_{34}O_6(N.OH)_2$
C	60,38 °/₀	59,96 °/₀
H	7,25 °/₀	7,55 °/₀
N	5,35 °/₀	5,85 °/₀

Es wurden nunmehr 5 g reiner Biliansäure mit 17 g gepulverten Ätzkalis gut gemischt und das Gemenge unter Zusatz von wenig Wasser in einer Silberschale am Ölbade im Laufe von ³/₄ Stunden bis auf 220° erhitzt. Die Schmelze wurde sodann in Wasser gelöst und die Lösung mit Schwefelsäure gefällt, der körnige Niederschlag abgesaugt, ausgewaschen, in 20 ccm Alkohol 95°/₀ in der Wärme gelöst, die Lösung mit 50 ccm kochendem Wasser versetzt und die getrübte Lösung stehen gelassen. Am nächsten Tage fand sich ein Bodensatz, der aus einem Gemenge schön ausgebildeter, schiefwinkliger Krystallblättchen und amorpher Partikeln bestand. Derselbe wurde abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen, sodann mit 50°/₀iger Essigsäure bei Zimmertemperatur behandelt, wobei die amorphen

---

[1]) S. Bondi und E. Müller, Synthese der Glykocholsäure und Taurocholsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 501, 1906.

[2]) Lassar-Cohn, Über Oxydationsprodukte der Cholalsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 683.

[3]) F. Pregl, Über Isolierung von Desoxycholsäure und Cholalsäure aus frischer Rindergalle und über Oxydationsprodukte dieser Säuren. Sitzungsber. d. Wien. Akad. 111, IIb, 1061 und Monatsh. f. Chem. 24, 19, 1903.

Beimengungen in Lösung gingen. Die Krystallmasse wurde sodann mit Äther gewaschen, in einem geringen Volumen kochenden Eisessigs gelöst, eine kleine Menge ungelösten Harzes abfiltriert und das Filtrat mit dem mehrfachen Volumen kochenden Wassers versetzt. Aus der getrübten Flüssigkeit schied sich beim Erkalten eine Krystallmasse ab, die aus mikroskopischen, schön ausgebildeten, schlanken, zu Sternen angeordneten Nadeln bestand. Am nächsten Tage wurden die Krystalle auf einem gehärteten Saugfilter gesammelt, einige Male mit absolutem Alkohol und mit Äther gewaschen, sodann im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug nur 0,2 g.

Das Präparat bräunte sich bei schnellem Erhitzen im Paraffinbade erst bei ca. 285° und schmolz bei 295 bis 298°, während eine gleichzeitig erhitzte Parallelprobe von Biliansäure einen Schmelzpunkt von 268 bis 273° zeigte.

Zum Zwecke der Analyse wurde das Präparat bei 108° getrocknet, wobei dasselbe eine bräunliche Färbung annahm. Die Analyse ergab:

0,1147 g Substanz gaben 0.2786 g CO_2 und 0,0888 g H_2O

C	66,17 %
H	8,63 %
O	25,20 %
	100,00 %

Eine Wiederholung des Versuches, wobei die Krystalle aber schließlich, statt aus verdünnter Essigsäure, aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert wurden, ergab, wiederum in sehr geringer Ausbeute, ein Präparat, dessen Schmelzpunkt jenseits 290° lag.

0,1518 g desselben wurde in 20 ccm $^n/_{10}$-NaOH gelöst und mit $^n/_{10}$-Oxalsäure unter Zusatz von Phenolphthalein als Indicator zurücktitriert, wobei ein Alkalibindungsvermögen von 10,2 ccm $^n/_{10}$-NaOH, entsprechend einer Aufnahme von 15,46 % Na, resultierte.

Die geringe Abweichung der gefundenen Werte von den der Biliansäure entsprechenden Zahlen legte den Gedanken nahe, ob nicht etwa die Krystalle einfach einen Rest unzersetzter Biliansäure darstellten.

Wir haben daher auf die vergleichsweise Feststellung der Schmelzpunkte des Kalischmelzproduktes und der Biliansäure besonderen Wert gelegt. Dieselbe erforderte um so mehr Aufmerksamkeit, als das Kalischmelzprodukt offenbar nicht

unzersetzt schmilzt; eine Veränderung desselben macht sich vielmehr bereits unterhalb des Schmelzpunktes durch eine Bräunung und Sinterung des Präparates kenntlich. Um den Moment der Verflüssigung mit größerer Sicherheit erkennen zu können, pflegten wir uns U-förmig gebogener Schmelzpunktröhren zu bedienen, deren einer Schenkel die zu prüfende Substanz aufnahm und die eine bequeme Beobachtung des Abfließens der geschmolzenen Tropfen in die Röhrenkrümmung gestatteten.

Wir haben nun, wie wir vorausschickend bemerken wollen, 6 verschiedene Präparate des Kalischmelzproduktes geprüft, wobei wir das Erhitzen im Schwefelsäure-, Paraffin- oder Luftbade, sowie auch im Thieleschen Blocke schneller oder langsamer vornahmen. Wir beobachteten ausnahmsweise bereits bei etwa 275°, in der Regel aber erst bei 280 bis 285° eine Bräunung des Präparates und bei 289 bis 300° ein Zusammenfließen zu braunen Tropfen.

Den Schmelzpunkt der Biliansäure beobachteten wir bei 265 bis 272°. Auch ein 5mal (erst aus Eisessig, dann aus Alkohol) umkrystallisiertes Präparat zeigte denselben Schmelzpunkt, ebenso ein besonders schönes, auf dem Wege der Verseifung aus dem Diäthylester gewonnenes Präparat, welches wir der Freundlichkeit des Herrn Prof. Pregl verdankten (Sp. 270 bis 272°). Der Genannte[1]) konnte durch Anwendung reichlicherer Mengen von Lösungsmitteln den Schmelzpunkt der Biliansäure allerdings noch um einige Grade höher rücken, als es den Angaben früherer Beobachter entsprach; doch erscheint auch in Pregls außerordentlich sorgfältigen Beobachtungen 275° als obere Grenze.

Es zeigte sich sonach, daß der Schmelzpunkt des Kalischmelzproduktes zweifellos höher lag, als derjenige der Biliansäure und daß die Krystalle daher keinesfalls aus einem Reste unveränderter Biliansäure bestehen konnten.

---

[1]) Pregl, l. c., S. 1052. „. . . . Nach oftmaligem luxuriösem Umkrystallisieren", sagt Pregl, „blieb der Schmelzpunkt von 274 bis 275° konstant. Ich lege darauf deshalb einigen Wert, weil alle bisherigen Beobachter niedrigere Schmelzpunkte für die reine Biliansäure angegeben haben, wohl deshalb, weil sie, um Materialverluste zu vermeiden, nicht genügend oft umkrystallisiert haben."

Es ergab sich nunmehr die angesichts der sehr geringen Ausbeute recht mühsame Aufgabe, eine nähere Charakterisierung des Produktes zu versuchen.

Nachdem zahlreiche Versuche, die Ausbeute günstiger zu gestalten, fehlgeschlagen waren und nur zu harzigen Produkten geführt hatten, nachdem es sich insbesondere als untunlich erwiesen hatte, größere Biliansäuremengen gleichzeitig in Arbeit zu nehmen, wurden 25 g reiner Biliansäure in Portionen von je 5 g wie oben der Kalischmelze unterworfen. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, daß das Ölbad ganz langsam im Laufe von $^3/_4$ Stunden auf 200 bis 210° erhitzt und sodann $^1/_2$ Stunde bei dieser Temperatur gehalten wurde. Die vereinigte wässerige Lösung der Schmelzen wurden mit Eisessig angesäuert, sodann noch mit etwas Schwefelsäure versetzt, die krümelige Fällung am nächsten Tage abgesaugt und mit Wasser gewaschen, sodann in Alkohol gelöst und mit kochendem Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt. Beim Erkalten schied sich ein Bodensatz ab, der teils aus kugeligen, konzentrisch gestreiften Aggregaten, teils aus zu Drusen angeordneten nadelförmigen, mikroskopischen Krystallen, teils endlich aus harzigen Partikeln bestand und dessen Menge beim Eindunsten der überstehenden Mutterlauge erheblich zunahm. Derselbe wurde abgesaugt, mit 50%iger Essigsäure verrieben und 1 Tag unter derselben belassen, wobei die harzigen Bestandteile vollständig in Lösung gingen. Das Krystallpulver wurde nunmehr mit verdünnter Essigsäure gewaschen und 2mal aus heißem, mit kochendem Wasser stark verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Das nunmehr durchwegs aus schön ausgebildeten Krystalldrusen bestehende Präparat wurde im Laufe einiger Wochen im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und erwies sich als aschefrei. Die Ausbeute betrug nur 3,7 g.

Die Analyse ergab:

a) 0,1137 g Substanz $\begin{cases} 0{,}2777 \text{ g } CO_2 = 66{,}58\,\%\ C \\ 0{,}0872 \text{ g } H_2O = 8{,}53\,\%\ H \end{cases}$

b) 0,1174 g Substanz $\begin{cases} 0{,}2882 \text{ g } CO_2 = 66{,}95\,\%\ C \\ 0{,}0874 \text{ g } H_2O = 8{,}26\,\%\ H \end{cases}$

c) 0,2793 g Substanz, in 40 ccm $^n/_{10}$-NaOH gelöst und mit $^n/_{10}$-Säure gegen Phenolphthalein zurücktitriert, ergaben eine Acidität, entsprechend 19,8 ccm $^n/_{10}$-NaOH = 0,0455 g Na = 16,32% Na.

Ein Teil des Präparates wurde bei 100 bis 110° zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dieselbe wurde erst nach Ablauf mehrerer Tage erreicht, wobei das Präparat eine bräunlich-gelbe Färbung annahm. In 2 Proben betrug die Gewichtsabnahme 3,85 und 4,56%.

Die Analyse dieses Produktes ergab:

d) 0,1226 g Substanz $\begin{cases} 0{,}2977 \text{ g } CO_2 = 66{,}23\% \text{ C} \\ 0{,}0890 \text{ g } H_2O = 8{,}07\% \text{ H} \end{cases}$

e) 0,1336 g Substanz $\begin{cases} 0{,}3246 \text{ g } CO_2 = 66{,}24\% \text{ C} \\ 0{,}1000 \text{ g } H_2O = 8{,}30\% \text{ H} \end{cases}$

f) 0,2717 g Substanz in $^n/_{10}$-NaOH gelöst, mit $^n/_{10}$-Säure gegen Phenolphthalein zurücktitriert; Acidität entsprechend 19,95 ccm $^n/_{10}$-NaOH = 0,0459 g Na = 16,89% Na (sehr spärliche dunkelgefärbte Flöckchen blieben in der verdünnten Lauge ungelöst, während das im Vakuum getrocknete Präparat darin restlos löslich war).

Es ergab sich nunmehr die Notwendigkeit, außer der prozentischen Zusammensetzung und der relativen Zahl titrierbarer Carboxylgruppen auch die Relation etwa vorhandener Carbonylgruppen quantitativ festzustellen.

Wir versuchten zunächst, in Analogie mit dem von Pregl[1]) bei Darstellung des Biliansäure-Dioxim geübten Vorgange ein Oxim darzustellen.

Zu diesem Behufe wurden 0,64 g der Säure mit 10 ccm $^n/_1$-NaOH und 0,33 g Hydroxylamin-Chlorhydrat am Wasserbade erwärmt. Die filtrierte Lösung wurde sodann mit Salzsäure angesäuert, der reichliche körnige Niederschlag auf gehärtetem Filter gesammelt und chlorfrei gewaschen. Der Versuch, die sehr leicht in Alkohol lösliche Substanz direkt aus Alkohol oder durch Eindunsten der wässerig-alkalischen Lösung im Vakuum über Schwefelsäure zur Krystallisation zu bringen, schlug fehl. Die Substanz zeigte, im Gegensatze zu dem leicht krystallisierbaren Oxim der Biliansäure, nicht die mindeste Krystallisationstendenz. Wir mußten uns daher mit einer orientierenden Ermittelung des Stickstoffgehaltes begnügen:

0,1278 g der Substanz gaben 7,6 ccm N (21°, 729 mm) = 0,0082 g N = 6,45% N.

(Dem Dioxim der Biliansäure entspricht ein Stickstoffgehalt von 5,85%.)

Ebensowenig gelang es uns, eine krystallisierbare Phenylhydrazinverbindung herzustellen. Die Reaktionsfähigkeit der Säure dem Phenylhydrazin gegenüber ergab sich jedoch unmittelbar beim Versetzen einer wässerigen Lösung des Natriumsalzes mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat, wo-

---

[1]) s. S. 376.

bei sogleich ein voluminöser, amorpher, grobflockiger Niederschlag ausfiel.

Wir versuchten nunmehr die relative Menge des von dem Kalischmelzprodukte gebundenen Phenylhydrazins nach dem Verfahren von Strache[1]) wenigstens annähernd quantitativ zu ermitteln.

Zu diesem Behufe wurde eine abgewogene Menge der Säure in einem Meßkölbchen in der zur Neutralisation berechneten Menge $^{n}/_{10}$-NaOH in der Wärme gelöst, die Lösung mit einem Überschusse von salzsaurem Phenylhydrazin und mit Natriumacetat versetzt; 1 Stunde am kochenden Wasserbade erwärmt, zur Marke aufgefüllt, sodann mehrere Stunden in die Kälte gestellt. Das ausgefallene Phenylhydrazid wurde nunmehr abfiltriert und in einem aliquoten Teile des Filtrates der darin enthaltene Phenylhydrazinrest auf volumetrischem Wege durch Ermittelung des beim Kochen mit Fehlingscher Flüssigkeit entwickelten Quantums gasförmigen Stickstoffes bestimmt. In einer Reihe von Parallelproben wurde der Wirkungswert der zugesetzten Phenylhydrazinmenge praktisch ermittelt.

Für 0,3981 g Substanz wurde so eine Aufnahme von 0,2452 g salzsaurem Phenylhydrazin gefunden. Unter der Annahme, daß eine Substanz von der Molekulargröße der Biliansäure vorläge, würde dieser Wert der Aufnahme von 1,84 Mol. Phenylhydrazin pro Molekül entsprechen.

Auf Grund der mitgeteilten Daten konnten wir nunmehr versuchen, uns eine Meinung über die Natur des Kalischmelzproduktes zu bilden.

Die Ergebnisse der Elementaranalysen und Schmelzpunktbestimmungen lenkten unsere Aufmerksamkeit zunächst in der Richtung der Cholansäure (Tappeiner, Latschinoff, Clève, Pregl). Diesem Oxydationsprodukte der Cholsäure kommt nach Pregl[2]) die Zusammensetzung $C_{24}H_{36}O_7$ (i. e. C 66,06 $^0/_0$, H 8,25 $^0/_0$) und ein Schmelzpunkt von 294 bis 295° zu. Auch die Aciditätsbestimmungen würden mit dieser Annahme übereinstimmen, insofern die Cholansäure nach Clève dreibasisch ist, was nach obiger Formel einer Na-Aufnahme von 15,83 $^0/_0$ entspräche.

In einem direkten Widerspruche zu dieser Annahme steht dagegen obiges Ergebnis der Carbonylbestimmungen, insofern

---

[1]) Strache, Monatsh. f. Chem. 12, 524, 1891. — Vgl. Meyer, Analyse und Konstitutionsermittelung organ. Substanzen, 1903, S. 453.

[2]) Pregl, l. c. S. 1036.

es auf die Anwesenheit von 2 Carbonylgruppen hinweist und die Cholansäureformel mit ihren 7 Sauerstoffatomen für die Koexistenz zweier Carbonyl- und dreier Carboxylgruppen (i. e. -Atome) ja keinen Raum bietet.

Wir durften uns also mit unseren Elementaranalysen nicht zufrieden geben; mußten uns vielmehr angesichts des vorliegenden Widerspruches sagen, daß unsere Präparate vielleicht doch noch eine hartnäckig anhaftende Beimengung enthalten konnten, und dies um so mehr, als beim Trocknen derselben eine merkliche Verfärbung zutage getreten war. Wir mußten also versuchen, durch die Wahl eines anderen Lösungsmittels beim Umkrystallisieren diesem Übelstande abzuhelfen.

Tatsächlich gelang es auch endlich, durch Anwendung von Eisessig zu einem einwandfreien Präparate zu gelangen.

20 g reiner, 3 mal umkrystallisierter Biliansäure wurden in Portionen von je 5 g genau wie oben mit Kali geschmolzen, die Schmelze wurde in Wasser gelöst, die stark verdünnte Lösung durch Eingießen in verdünnte Schwefelsäure gefällt, die körnige Fällung lufttrocken in einem möglichst kleinen Volumen kochenden Eisessigs gelöst und der Überschuß desselben am Ölbade vertrieben. Beim Erkalten der eingeengten Lösung krystallisierten glitzernde, aus kurzen Nadeln zusammengesetzte Krystalldrusen aus. Nach Verdünnung mit Äther wurde der Krystallbrei auf einem Saugfilter gesammelt, mit Äther gewaschen und zweimal aus Alkohol umkrystallisiert. Das so in Form feiner mikroskopischer Nadeln erhaltene Präparat wurde auf einem gehärteten Saugfilter gesammelt, wiederholt mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Dasselbe blieb auch nach dem Trocknen schneeweiß.

Beim Erhitzen im Paraffinbade begann die Substanz bei etwa 275° zu sintern. Die Verflüssigung erfolgte jedoch erst bei 289 bis 290°.

Die Ausbeute betrug diesmal nur 0,4 g.

Die Analyse ergab:

a) 0,1166 g Substanz: 0,2742 g CO_2 = 64,92 % C

b) 0,1123 g „ 0,2678 g CO_2 = 65,00 % C; 0,0826 g H_2O = 8,19 % H

c) 0,0805 g „ 0,1920 g CO_2 = 65,09 % C; 0,0575 g H_2O = 7,95 % H

Die Formel der Biliansäure $C_{24}H_{34}O_8$ erfordert die Werte 64,00 % C und 7,55 % H, sowie eine Acidität ent-

sprechend der Aufnahme von 15,34% Na; sie bietet Raum für die gleichzeitige Gegenwart von 2 Carbonyl- und 3 Carboxylgruppen und vermag also unseren analytischen Befunden vielleicht am einfachsten und ungezwungensten zu genügen.

Allerdings sind die um etwa 1% zu hohen Kohlenstoffzahlen, welche in der Mitte zwischen den von der Biliansäure- und Cholansäureformel ($C_{24}H_{36}O_7$) geforderten Werten liegen, immerhin auffallend und erscheint die Möglichkeit, daß ein komplizierteres Kondensationsprodukt vorliege, keineswegs ausgeschlossen.

Daß es sich aber keinesfalls um typische Biliansäure handeln könne, lehrt die Schmelzpunktbestimmung sowie die Tatsache, daß die Biliansäure aus verdünntem Alkohol mit 2 Molekülen (bei 130° entweichenden) Krystallwassers krystallisiert, was bei unserem Produkte nicht der Fall ist.

Ebensowenig ist das Produkt mit der Isobiliansäure (Sp. 244 bis 245°) identisch. Dasselbe würde vielmehr, die Richtigkeit der Formel $C_{24}H_{34}O_8$ vorausgesetzt, einer weiteren isomeren Modifikation der Biliansäure entsprechen.

Die außerordentlichen Schwierigkeiten, die sich der Gewinnung des Produktes entgegenstellten, die Unsicherheit seiner Bereitung sowie die sehr geringe Ausbeute haben uns vorderhand nicht gestattet, unsere Versuche auf die Darstellung von Estern und Salzen, sowie auf die Ermittelung optischer Konstanten und des Molekulargewichtes auszudehnen, und bedürfen unsere Beobachtungen nach dieser Richtung hin einer Ergänzung.

Die uns in erster Linie interessierende Frage glauben wir jedoch in dem Sinne beantwortet zu haben, daß dem Atomverbande der Cholsäure bzw. der Biliansäure ein so außerordentlich festes Gefüge zukommt, daß dieses sogar der langdauernden Einwirkung der Kalischmelze ohne tiefgreifende Veränderungen Widerstand zu leisten vermag.

Über den Einfluß intraperitonealer Injektionen von Trypsin und Pankreasgewebe auf die Stickstoffausscheidung und den Eiweißzerfall.

Von

Otto v. Fürth und Karl Schwarz, Wien.

(Ausgeführt mit Unterstützung der Elizabeth Thompson Science Fund, Boston.)

(Eingegangen am 17. Juli 1909.)

Mit 4 Figuren im Text.

I.

Trotzdem die hochgradige Toxizität von auf intraperitonealem Wege eingeführtem Trypsin oder Pankreasgewebe längst bekannt ist und diese Giftigkeit mit der relativen Unschädlichkeit anderer auf gleichem Wege in den Organismus eingebrachter Fermente und Gewebe in auffallender Weise kontrastiert, ist über die Einwirkung dieser Agentien auf den Eiweißstoffwechsel und die Stickstoffausscheidung nichts Positives bekannt. Die vorliegende Untersuchung wurde in der Absicht in Angriff genommen, eine Ausfüllung dieser Wissenslücke zu versuchen und insbesondere die Frage zu beantworten, ob eine Überschwemmung des Organismus mit Trypsin einen vermehrten Eiweißzerfall zur Folge habe. Lag es doch nahe, die vorerwähnte Toxizität des Pankreasgewebes und seines tryptischen Fermentes mit einer stürmischen Mobilisierung der Gewebsproteide und einem gewissermaßen gewaltsamen Abbau derselben in Zusammenhang zu bringen.

Eine Reihe älterer Angaben über die Toxizität des Pankreas und des tryptischen Fermentes finden sich in Arbeiten über künstliche Erzeugung der Fettgewebsnekrose, und verweisen wir in bezug auf dieselben auf die in einer ausführlichen neueren Arbeit von G. Wells[1]) enthaltenen Literaturzusammenstellung.

---

[1]) H. Gideon Wells, Experimental fat necrosis (from the pathological Laboratory of the University of Chicago.) Journ. of med. Research. 9, 70, 1903.

Achalme[1]) machte die interessante Wahrnehmung, daß Tiere durch Vorbehandlung mit kleinen Trypsindosen gegen die Wirkung größerer Gaben immunisiert werden können. Injiziert man Meerschweinchen eine Pankreatinlösung subcutan, so entstehen ausgedehnte Nekrosen. Intraperitoneale Injektionen gleicher Mengen werden besser vertragen und bewirken nur eine mäßige Reizung des Peritoneums. Hat man aber dem Tiere einige intraperitoneale Injektionen gemacht, so verträgt es nunmehr auch die subcutane Injektion, und die Nekrosen bleiben aus. Das Serum so vorbehandelter Tiere erweist sich in vitro antitryptisch[2]) und schützt, gleichzeitig mit einer Trypsinlösung subcutan eingespritzt, normale Tiere vor der Nekrose.

Die Beobachtungen Achalmes wurden von G. v. Bergmann[3]) in vollem Maße an Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden bestätigt. Für Meerschweinchen beträgt die Dosis letalis 0,2 bis 0,5 g, für Kaninchen 0,5 bis 1,5 g Trypsin Grübler.

Nach Vorhandlung mit mehrmaligen kleinen Dosen vertrugen die Tiere die mehrfache letale Dosis, und zwar gelang die Vorbehandlung auch mit Trypsin, das durch Erwärmen auf 70° proteolytisch inaktiviert worden war.

Nach den Untersuchungen von Bergmann, Gulecke[4]) und Doberauer[5]) wirkt ein im Körper eines Hundes nekrotisch zerfallendes Pankreas tödlich, und zwar gleichgültig ob es das körpereigne Pankreas ist, das auf experimentellen Wege zum Zerfall gebracht wird, oder das unter aseptischen Kautelen transplantierte Pankreas eines anderen Individuums. Das Pankreas eines verdauenden Tieres scheint giftiger zu sein als dasjenige eines hungernden; auch vorausgegangene Autolyse steigert die Toxizität.

Durch Vorbehandlung mit Trypsin gelang es v. Bergmann, Hunde derart zu immunisieren, daß sie die Implantation eines ganzen fremden Pankreas vertrugen, ein Eingriff, der so oft er beim nicht vorbehandelten Tiere ausgeführt wurde, stets nach längstens 20 Stunden den Tod des Versuchstieres zur Folge hatte.

Die einzige, jedoch recht dürftige Angabe, die wir über eine Beeinflussung des allgemeinen Stoffwechsels durch Trypsinzufuhr ausfindig

---

[1]) P. Achalme, Recherches sur les propriétés pathogènes de la trypsine et le pouvoir antitryptique du sérum de cobayes neufs et immunisés. Annales de l'Inst. Pasteur 15, 737, 1901.

[2]) Vgl. diesbezüglich die negativen Antifermentversuche von Schütze und Bergell (Zur Kenntnis der Antifermente, Zeitschr. f. klin. Med. 61, 366, ferner: Zeitschr. f. Hygiene 50, 304) und demgegenüber die Versuche von Bamberg (Ein Beitrag zum Verhalten des Trypsins jenseits der Darmwand, Zeitschr. f. experim. Pathol. 5, 1909.)

[3]) G. v. Bergmann, Die Todesursache bei akuten Pankreaserkrankungen. Zeitschr. f. experim. Pathol. 3, 400, 1906.

[4]) N. Gulecke, Über die experimentelle Pankreasnekrose und die Todesursache bei akuten Pankreaserkrankungen. Arch. f. klin. Chir. 85, 644, 1908;

[5]) G. Doberauer, Über die sogen. akute Pankreatitis usw. Beiträge z. klin. Chir. 48, 456, 1906.

machen konnten, rührt von Loeper und Esmonet[1]) her, die nach Verfütterung von Pankreatin eine Abmagerung ihrer Versuchstiere bemerkten: „C'est ainsi que trois lapins, ayant reçu en ingestion 0,3 à 0,8 g de Pancréatinine par kg d'animal ont respectivement maigri de 130, 150 et 220 g . . . L'amaigrissement ne va pas en croissant avec le nombre des injections . . . Mais cet amaigrissement, tout en allant en diminuant, est encore très perceptible à la dixième ingestion." Nach Pankreatininjektion wurde einige Male Albuminurie und Glykosurie beobachtet.

Es ergab sich nunmehr für uns zunächst die Aufgabe, den Einfluß steigender, auf intraperitonealem Wege beigebrachter Trypsindosen auf die Stickstoffausscheidung im Stickstoffgleichgewichte befindlicher Hunde sorgfältig zu studieren.

Sodann gingen wir daran, die Wirkung intraperitonealer unter aseptischen Kautelen ausgeführter Injektionen von Pankreasemulsion in analoger Weise zu studieren, wobei wir jedoch, um eine akute Vergiftung unserer Versuchstiere hintanzuhalten, dieselben erst einer Vorbehandlung mit steigenden Trypsindosen unterwarfen und so befähigten, selbst größere Pankreasgaben vertragen zu können.

II.

Vorbereitung des Versuchsmaterials.

Als Trypsinpräparat diente uns Grüblers Trypsin, von dem ein größeres Quantum gleichzeitig angeschafft und gleichmäßig gemischt wurde, um nicht durch Unterschiede zwischen verschiedenen Präparaten in der Dosierung irregeführt zu werden.

Zum Zwecke der Injektion diente uns anfänglich eine Lösung desselben in Chloroformwasser (die in manchen Fällen vor der Injektion durch Vakuumdestillation bei niederer Temperatur vom Chloroform befreit worden war). Doch fanden wir es später praktischer, eine frisch bereitete und durch ein steriles Filter filtrierte Lösung in ausgekochter physiologischer Kochsalzlösung einzuspritzen.

Besondere Sorgfalt erforderte die aseptische Durchführung der Injektion von Pankreasgewebe. Als höchst wertvoller Behelf erwies sich uns in dieser Hinsicht die sterilisierbare

[1]) Loeper et Esmonet, La résorption intestinale des ferments peptique et pancréatique et son action sur la nutrition générale. Compt. rend. Soc. Biol. 64, 987, 1908; vgl. auch S. 885 und 939.

Schneide- und Zerreibungsmaschine, Modell des hygienischen Institutes zu Berlin[1]), die Organe in einen so feinen Brei verwandelt, daß dieselben nach Verdünnung desselben mit Hilfe einer größeren Pravazschen Spritze injiziert werden können.

Um Bakterienwirkungen bei unseren Versuchen mit Schlachthausmaterial soweit als nur irgend möglich auszuschließen, wurde das dem frisch geschlachteten Tiere (Rind) entnommene Organ unmittelbar in ein steriles gut verschließbares Gefäß gebracht, aus diesem in ganz frischem Zustande für 20 Sekunden in siedendes Wasser übertragen (um die ihm oberflächlich anhaftenden Mikroorganismen unschädlich zu machen), aus dem siedenden Wasser direkt nach Entfernung der äußeren abgebrühten Partien in den sterilisierten Zerkleinerungsapparat gebracht, der Organbrei in sterilen, vorher gewogenen verschließbaren Glasdosen aufgefangen, mit ausgekochter physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und mit Hilfe einer sterilisierten Spritze eingespritzt.

Um mehrere Injektionen an aufeinander folgenden Tagen mit demselben Organbrei ausführen zu können, gingen wir zuweilen so vor, daß wir den Organbrei in einem sterilen starkwandigen Reagensglase auffingen und dieses in eine mit Kältemischung gefüllte sog. „Thermosflasche“ (Dewarsches Gefäß) einbrachten. Es gelingt so in einfacher Weise, den Organbrei in gefrorenem Zustande tagelang aufzubewahren.

Vorversuche über die Giftigkeit des Trypsins und der Pankreassubstanz.

Versuch a. Hund, 6,9 kg, erhielt am 26. X. 0,5 g Trypsin, am 28. X. 1,0 g, am 3. XI. 1½ g, am 24. XI. 2 g, am 22. XII. 2½ g Trypsin intraperitoneal. Am 16. I. wurde ihm ein ganzes, frisch und steril entnommenes und fein zerkleinertes Hundepankreas injiziert. Am nächsten Tage lag das Tier matt am Boden und wurde tags darauf tot aufgefunden. Die Sektion ergab allgemeine Fettgewebsnekrose im Bereiche der ganzen Bauchhöhle, daneben fibrinöse Peritonitis und eine reichliche Menge blutig-seröser Flüssigkeit in der Bauchhöhle.

Versuch b. 2 Kaninchen, 4 kg bzw. 3,8 kg, erhielten am 19. X. 0,2 g Trypsin, am 21. X. 0,4 g, am 23. X. 0,6 g, am 28. X. 1,0 g, am 28. X. 1,3 g, am 6. XI. 1,6 g Trypsin intraperitoneal. Am 8. XI. wurden beide Tiere tot aufgefunden.

---

[1]) Vgl. die Abbildung in dem Katalog der Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf Nr. 147.

Versuch c. Kaninchen, 2,6 kg, erhielt am 13. XI. 0,2 g, am 24 XI. 0,5 g, am 22. XII. 0,7 g, am 11. I. 1 g Trypsin intraperitoneal, ferner am 18. II. 1 g Rindpankreas, am 22. II. 2 g Rindpankreas. Das Tier blieb zunächst am Leben; wurde jedoch am 2. III. tot aufgefunden. Keine Zeichen von Peritonitis; keine Fettgewebsnekrose.

Versuch d. Kaninchen, 2,1 kg, erhielt am 13. XI. 0,2 g, am 24. XI. 0,5 g, am 12. XII. 0,7 g, am 11. I. 1,0 g, am 30. I. wieder 1 g Trypsin. Wurde am 5. II. tot aufgefunden. Weder Peritonitis noch Fettgewebsnekrose.

Versuch e. Kaninchen, 2,5 kg, erhielt ohne Vorbehandlung 10 g Rindspankreas intraperitoneal. Starb 2 Stunden darauf. Bauchfell glatt, keine Blutung.

Versuch f. 3 Kaninchen von 2 kg Gewicht erhalten α) 1,2 g, β) 2,4 g und γ) 3,6 g Rindspankreas intraperitoneal. Am nächsten Tage werden β) und γ) tot aufgefunden, α) bleibt anscheinend gesund und erhält eine Woche später 2,4 g Pankreas. Wird am nächsten Tage tot aufgefunden. Die Sektion ergab in allen Fällen blutig-seröses Exsudat.

Versuch g. Kaninchen 2 kg. Wurde nach Injektion von 1,2 g Rindspankres am nächsten Tage tot aufgefunden; Sektion wie vorhin.

Trotz der hochgradigen Toxizität sowohl des Trypsins als auch des Pankreasgewebes und trotzdem die vorstehenden Versuche lehren, daß auch vorsichtige Vorbehandlung mit Trypsin keineswegs einen absoluten Schutz gegen nachfolgende Pankreasbehandlung gewährt, ist es uns immerhin einige Male gelungen, mit Trypsin vorbehandelten Hunden größere Pankreasgaben ohne ersichtlichen Schaden beizubringen und den Gang der Stickstoffausscheidung bei ihnen zu verfolgen.

Methodik der Stoffwechselversuche.

Die Stoffwechselversuche wurden an weiblichen Hunden durchgeführt, denen durch die Operation nach Falck die Mündung der Urethra freigelegt worden war.

Die Hunde wurden täglich einmal, und zwar gegen 10 Uhr vormittags nach erfolgter Katheterisierung gefüttert. Das Futter bestand je nach der Größe aus 200 bis 350 g mageren, sorgfältig von anhaftendem Fette befreiten gekochten Pferdefleisches mit einer Zulage von Fett und wurde derart bemessen, daß es einem Caloriengehalte von zirka 60 Calorien pro Kilo entsprach. Es gelang unschwer, die Hunde daran zu gewöhnen, die gesamte Futterration schnell zu verzehren, indem man ihnen das verschmähte Futter nach kurzer Zeit wegnahm. Erst nachdem die Hunde an eine gleichmäßige Nahrungsaufnahme gewöhnt worden waren, wurde der eigentliche Versuch in Angriff genommen.

Jeden Tag um 10 Uhr vormittags wurde der Versuchshund katheterisiert, der verglaste Glaskäfig sorgfältig mit Hilfe einer Spritzflasche ausgespült, der abgeflossene und mit dem Katheter entleerte Harn mit dem Spülwasser vereinigt, das Flüssigkeitsquantum abgemessen und filtriert. In zwei aliquoten Teilen wurden sodann der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

Der Kot wurde innerhalb einer längeren Versuchsperiode gesammelt, unter Alkohol- und Schwefelsäurezusatz am Wasserbade getrocknet, gepulvert, gewogen und der Stickstoffgehalt in einem aliquoten Teile desselben ermittelt.

Die Injektionen wurden immer nach dem Katheterisieren vor der Fütterung gemacht.

Wir gehen nunmehr zur Mitteilung unserer Versuchsdaten über.

III.

Trypsinversuche.

Stoffwechselversuch A.

Hündin, Gewicht 7,100 kg. Tägliche Nahrung: 250 g gekochtes Pferdefleisch und 30 g Fett. Dieselbe enthielt auf Grund des Königschen Mittelwertes für den Stickstoffgehalt des Pferdefleisches (3,51 %) 8,77 g N.

Zwei Kotrollanalysen von Fleischproben ergaben 3,51 und 3,35 % N.

Datum	Gewicht d. Hundes kg	Intra-periton. Injektion	Harnmenge ccm	Kot-gewicht	Tägliche Stickstoffausscheidung Harn g		Kot g	Sa g	N-Bilanz	Anmerkungen
Nov. 26.	7,10				5,24 5,27					
27.	7,10				6,79 6,90					
28.	7,15		400		7,57					
29.	7,15				7,57					
Dez. 1.	7,00		250		8,20 8,09					
2.	7,00		350		7,83 7,73					
3.	6,90		340		8,86 8,60	8,73	(0,26)	8,99	+ 0,22	
4.	6,90		410		8,68 8,66	8,67	(0,26)	8,93	+ 0,16	Hund befindet sich im approx. N-Gleichgewicht.
5.	6,90	½ g Trypsin	390		8,73 8,80	8,77	(0,26)	9,03	+ 0,26	
6.	6,90		400		6,80 6,81	6,81	(0,26)	7,07	— 1,70	
7.	6,80		410		11,51 11,51	11,53	(0,26)	11,79	+ 3,02	Gesamtbilanz + 3,02 — 3,14 — 0,12
8.	6,90		480		7,02 7,05	7,04	(0,26)	7,30	— 1,44	
9.	6,90		790		8,49 8,52	8,51	0,26	8,77	∅	

Datum	Gewicht d. Hundes kg	Intraperiton. Injektion	Harnmenge ccm	Kotgewicht	Tägliche Stickstoffausscheidung Harn g		Kot g	Sa. g	N-Bilanz		Anmerkungen
Dez. 10.	6,90	1 g Trypsin	675		8,45 8,43	8,44	0,26	8,70	— 0,07		Nach der Injektion erfolgt Erbrechen. Das Erbrochene wird wieder gefressen.
11.	7,30		70		1,81 1,86	1,83	0,26	2,09	— 6,68	Gesamtbilanz (11.–18. Dez.): + 14,29 — 14,37 = — 0,08	
12.	7,00		455	Kotgewicht von 10 Tagen gesammelt 38,[illegible]5 g enthaltend 2,60 / 2,66 Mittel 2,63 g N = 0,26 g N pro Tag. (12.–21. Dez.)	16,43 16,34	16,38	0,26	16,64	+ 7,87		
13.	7,00		240		5,46 5,38	5,42	0,26	5,68	— 3,09		
14.	7,10		470		10,23 10,26	10,25	0,26	10,51	+ 1,75		
15.	7,30		270		6,86 6,88	6,87	0,26	7,13	— 1,64		
16.	7,30		560		11,54 11,56	11,55	0,26	11,81	+ 3,06		
17.	7,30		560		5,57 5,53	5,55	0,26	5,81	— 2,96		
18.	7,30		565		10,14 10,14	10,14	0,26	10,40	+ 1,63		
19.	7,30		380		8,65		0,26	8,91	+ 0,14		Approxim. Stickstoffgleichgew. (19. Dez.–10. Jan.)
20.	7,20		425		8,62 8,62	8,62	0,26	8,88	+ 0,11		
21.	7,20		450		8,63 8,59	8,61	0,26	8,87	+ 0,10		
Jan. 8.	8,00		470	Kot von 15 Tagen 50,7 g (trocken) Mittlerer N-Gehalt 0,28 g N pro Tag. (8.–18. Jan.)	8,64		0,28	8,92	+ 0,15		
9.	8,00		520		8,62 8,63	8,63	0,28	8,91	+ 0,14		
10.	8,00		500		8,68		0,28	8,96	+ 0,19		
11.	8,00	$1^1/_2$ g Trypsin	500		8,68		0,28	8,96	+ 0,19	Gesamtbilanz vom 11. bis 29. I.: + 12,84 g N — 2,05 = + 10,79 g N	
12.	8,10		710		8,24 8,36	8,30	0,28	8,58	— 0,19		
13.	8,00		815		13,40 13,46	13,43	0,28	13,71	+ 4,94		
14.	8,00		400		7,98 7,97	7,98	0,28	8,26	— 0,51		
15.	8,00		400		9,47 9,58	9,53	0,28	9,81	+ 1,04		
16.	8,00		465		8,38 8,42	8,40	0,28	8,68	— 0,09		
17.	8,00		490		9,75 9,73	9,74	0,28	10,02	+ 1,25		
18.	8,00		545		9,70 9,78	9,74	0,28	10,02	+ 1,25		

Datum	Gewicht d. Hundes kg	Intra-periton. Injektion	Harnmenge ccm	Kot-gewicht	Tägliche Stickstoff-ausscheidung Harn g		Kot g	Sa. g	N-Bilanz		Anmerkungen
Jan.											
19.	8,00		420	Kot von 15 Tagen 50,7 g (trocken). Mittlerer N-Gehalt 0,28 g pro Tag.	8,96 8,92	8,93	0,28	9,21	+ 0,44	Gesamtbilanz vom 11. bis 29. I. + 12,84 g N − 2,05 = + 10,79 g N	
20.	8,10		650		8,97 8,94	8,96	0,28	9,24	+ 0,47		
21.	8,10		515		8,61 8,65	8,63	0,28	8,91	− 0,14		
22.	8,05		450		8,66 8,63	8,65	0,28	8,93	+ 0,16		
23.	8,05		700		7,79 7,83	7,81	(0,28)	8,09	− 0,66		
24.	8,05		940		9,37		(0,28)	9,63	+ 0,86		
25.	8,05				9,37		(0,28)	9,63	+ 0,86		
26.	8,05		620		9,51		(0,28)	9,79	+ 1,02		
27.	8,05		495		8,69 8,72	8,71	(0,28)	8,99	+ 0,22		Approxim. Stickstoffgleichgewicht.
28.	8,10		370		8,05 8,09	8,07	(0,28)	8,35	− 0,42		
29.	8,10		360		8,28 8,35	8,31	(0,28)	8,59	− 0,18		
Febr.											
4.	8,20		485	4. bis 27. II. 98,6 g Kot. Mittlerer N-Gehalt 0,31 g N pro Tag.	8,02 8,04	8,03	0,31	8,34	− 0,43		
5.	8,20		425		8,60 8,63	8,62	0,31	8,93	+ 0,16		
6.	8,20		405		8,77 8,88	8,83	0,31	9,14	+ 0,37		
7.	8,20		840		8,72		0,31	9,03	+ 0,26		
8.	8,20				8,75		0,31	9,06	+ 0,29		
9.	8,20	2 g Trypsin	550		8,76		0,31	9,07	+ 0,30		
10.	8,10		570		5,49 5,47	5,48	0,31	5,79	− 2,98	Gesamtbilanz vom 10. bis 22. II. + 10,90 g N − 3,61 = + 7,29 g N	
11.	8,10		670		10,89 10,92	10,91	0,31	11,22	+ 2,45		
12.	8,20		520		7,86 7,84	7,85	0,31	8,16	− 0,61		
13.	8,20		580		9,63		0,31	9,94	+ 1,17		
14.	8,30		885		8,91		0,31	9,22	+ 0,45		
15.	8,30				8,91		0,31	9,22	+ 0,45		
16.	8,25		475		9,49 9,50	9,50	0,31	9,81	+ 1,04		
17.	8,30		405		8,43 8,45	8,44	0,31	8,75	− 0,02		

Datum	Gewicht d. Hundes kg	Intraperiton. Injektion	Harnmenge ccm	Kotgewicht	Tägliche Stickstoffausscheidung Harn g		Kot g	Sa. g	N-Bilanz		Anmerkungen
Febr.											
18.	8,30		560	4. bis 27. II. 98,6 g Kot. Mittlerer N-Gehalt 0,31 g N pro Tag.	9,51		0,31	9,82	+ 1,05	Gesamtbil. v. 10.-22. II. + 10,90 g N − 3,61 / + 7,29 g N	
19.	8,30		410		9,55 / 9,55	9,55	0,31	9,86	+ 1,07		
20.	8,30		490		9,04 / 8,62	8,83	0,31	9,14	+ 0,37		
21.	8,30		710		9,90		0,31	10,21	+ 1,44		
22.	8,30				9,87		0,31	10,18	+ 1,41		
23.	8,30		410		8,26 / 8,22	8,24	0,31	8,55	− 0,22		Approxin. Stickstoffgleichgewicht.
24.	8,30		320		8,67 / 8,62	8,65	0,31	8,96	+ 0,19		
25.	8,30		?		8,64 / 8,70	8,67	0,31	8,98	+ 0,21		
26.	8,30		?		8,69 / 8,71	8,70	0,31	9,01	+ 0,24		
27.	8,30		485		8,72 / 8,62	8,67	0,31	8,98	+ 0,21		
28.	8,30	2 g gekochtes Trypsin	905		8,66		(0,31)	8,97	+ 0,20		
März 1.	8,35				8,66		(0,31)	8,97	+ 0,20		
2.	8,35		420		8,00 / 8,00	8,00	(0,31)	8,31	− 0,44	Gesamtbilanz + 2,18 − 1,39 / + 0,79	
3.	8,40		410		7,29 / 7,29	7,29	(0,31)	7,60	− 1,17		
4.	8,40		400		7,89 / 7,89		(0,31)	8,20 / 8,20	− 0,57		
5.	8,50		540		9,87 / 9,83	9,85	(0,31)	10,16	+ 1,39		
6.	8,50		520		8,67 / 8,75	8,71	(0,31)	9,02	+ 0,25		Approxim. N-Gleichgewicht.
7.			820		8,80		(0,31)	9,11	+ 0,34		
8.					8,84		(0,31)	9,15	+ 0,38		
10.			420		8,81 / 8,85	8,83	(0,31)	9,14	+ 0,37		
11.					8.35 / 8,35	8,35	(0,31)	8,66	− 0,11		
12.		5 g Rindspankreas									

Der Hund wird bald nach der offenbar sehr schmerzhaften Injektion apathisch und comatös. Wird am nächsten Morgen tod aufgefunden. Sektion: Starke Hyperämie des Peritoneums. Blutig-seröses Exsudat.

Stoffwechselversuch B.

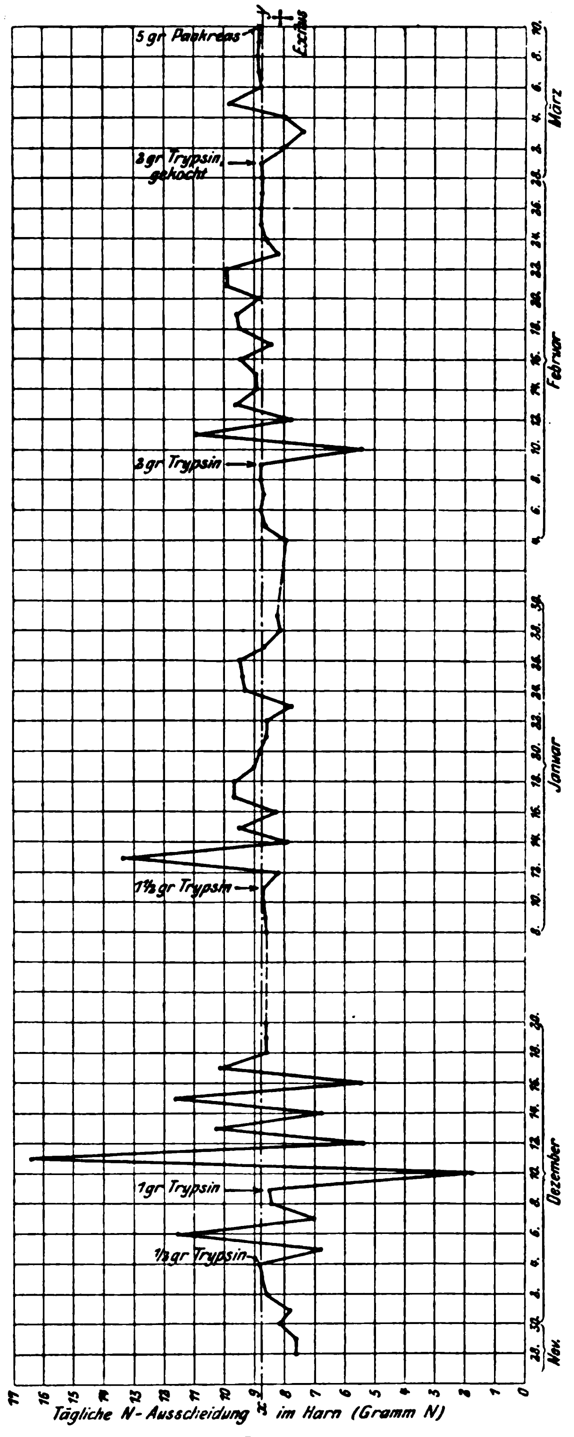
Hündin. Gewicht 5700. Tägliche Nahrung 250 g Fleisch (= 8,77 g N), dazu erst 30, dann 15 g Fett.

Datum	Gewicht d. Hundes kg	Intra-periton. Injektion	Harnmenge ccm	Kot-gewicht	Tägliche N-Ausscheidung Harn-N g	Kot-N g	Sa. g	N-Bilanz	Anmerkungen
Jan.									
22.	5,70		175		8,82 / 8,8 } 8,83				
23.	5,65		195		8,63 / 8,66 } 8,65	0,28	8,93	+ 0,15	
24.	5,70	½ g Tryps.	} 654	Kot trocken Gesamtgewicht 55 g enthaltend 0,28 g N pro Tag.	8,10	0,28	8,38	— 0,39	
25.	5,70				8,10	0,28	8,38	— 0,39	
26.	5,70		320		5,51 / 5,75 } 5,63	0,28	5,91	— 2,86	Gesamtbilanz + 3,34 g N — 5,19 / — 1,85 g N.
27.	5,70		420		11,86 / 11,79 } 11,83	0,28	12,11	+ 3,34	
28.	5,65		210		7,28 / 7,18 } 7,23	0,28	7,51	— 1,26	
29.	5,65		280		8,22 / 8,17 } 8,20	0,28	8,48	— 0,29	
Febr.									
3.	5,65		320		8,42 / 8,42 } 8,42	0,28	8,70	— 0,07	
4.			240		6,92 / 6,98 } 6,95	0,28	7,23	— 1,54	
5.					8,89 / 9,03 } 8,96	0,28	9,22	+ 0,45	
6.			305		7,73 / 7,80 } 7,77	0,28	8,05	— 0,72	
7.			} 640		8,77 / 8,70 } 8,74	0,28	9,02	+ 0,25	
8.					8,77 / 8,70 } 8,74	0,28	9,02	+ 0,25	
9.		1 g Trypsin	?		8,75 / 8,56 } 8,66	0,28	8,94	+ 0,17	} Hat einen Teil des Futters verschmäht.
10.	5,45		660	Kot 10.II.—2.III. Trockengewicht 69,3 g enthält 0,29 g N pro Tag.	4,98 / 4,95 } 4,97	0,29	5,26	— 2,56	
11.	5,50		400		10,89 / 10,89 } 10,89	0,29	11,18	+ 2,41	Gesamtbilanz vom 9. bis 23. II. + 7,12 g N — 4,13 / + 2,99 g N.
12.	5,60		420		7,86 / 7,88 } 7,87	0,29	8,16	— 0,61	
13.	5,60		365		8,29 / 8,40 } 8,35	0,29	8,64	— 0,09	
14.	5,60 }		} 1010		9,03	0,29	9,32	+ 0,55	
15.	5,60				9,22	0,29	9,51	+ 0,74	

Datum	Gewicht d. Hundes kg	Intra-periton. Injektion	Harnmenge ccm	Kot-gewicht	Tägliche N-Ausscheidung Harn-N g		Kot-N g	Sa. g	N-Bilanz	Anmerkungen
Febr.										
16.	5,60		420	Kot 10. II. bis 3. III. Trockengew. 69,3 g enthält 0,29 g N pro Tag.	9,07 9,16	9,12	0,29	9,41	+ 0,64	Gesamtbilanz vom 9. bis 23. II. + 7,12 g N − 4,13 + 2,99 g N.
17.	5,60		540		8,11 8,27	8,19	0,29	8,48	− 0,29	
18.	5,60		420		9,77		0,29	10,06	+ 1,29	
19.	5,60		390		9,05 9,05	9,05	0,29	9,34	+ 0,57	
20.	5,60		410		8,98 9,05	9,03	0,29	9,32	+ 0,55	
21.	5,60		750		8,10		0,29	8,39	− 0,38	
22.	5,60				8,09		0,29	8,38	− 0,39	
23.			395		8,68		0,29	8,97	+ 0,20	
März										Futterration um 15 g Fett vermindert.
13.	5,50		210		8,78 8,74	8,76	0,24	9,00	+ 0,23	Stickstoff-gleichgewicht.
14.	5,50		730		8,50		0,24	8,74	− 0,03	
15.	5,50				8,44		0,24	8,68	− 0,09	
16.	5,50		370		8,49 8,52	8,51	0,24	8,75	− 0,02	
17.	5,50		350		8,46		0,24	8,70	− 0,07	
18.	5,50	1 g gekochtes Trypsin	315		8,44 8,36	8,40	0,24	8,64	− 0,13	
19.	5,50		320		6,27 6,46	6,37	0,24	6,61	− 2,16	Gesamtbilanz − 10,19 g N + 3,34 − 6,85 g N.
20.	5,50		310		10,80 10,82	10,81	0,24	11,04	+ 2,27	
21.	5,50		330		9,60 9,64	9,62	0,24	9,86	+ 1,07	
22.	5,50		180		3,15 3,19	3,17	0,24	3,41	− 5,36	
23.	5,50		210		5,52 5,52	5,52	0,24	5,76	− 2,01	
24.	5,50		270		7,78 7,92	7,85	0,24	8,09	− 0,66	

Überblicken wir nunmehr die beiden mitgeteilten Stoffwechselversuche, so gelangen wir zu folgendem Ergebnisse:

Durch die intraperitoneale Injektion größerer Mengen Grüblerschen Trypsins ist das Stickstoffgleichgewicht stets in dem Sinne gestört worden, daß die vorher annähernd horizontal verlaufende Stickstoff-



5 gr Pankreas
Exitus
3 gr Trypsin, gekocht
März
Februar
3 gr Trypsin
Januar
1½ gr Trypsin
Dezember
1 gr Trypsin
½ gr Trypsin
Nov.
Tägliche N-Ausscheidung im Harn (Gramm N)

Fig. 1.

ausscheidungskurve einen unregelmäßigen, durch eine Aufeinanderfolge mehr oder minder ausgeprägter, abwechselnder Senkungen und Hebungen charakterisierten Verlauf annahm. Diese Schwankungen erstreckten sich über einen Zeitraum von 1 bis 2 Wochen und bestanden noch zu einer Zeit, wo die der Injektion unmittelbar folgende (sich durch anfängliche Unruhe, folgende Apathie und Freßunlust manifestierende) innerhalb eines Tages abklingende Störung des Allgemeinbefindens längst verschwunden war und die Tiere einen vollkommen normalen Eindruck machten.

An die verdauende Wirkung des Trypsins als solche kann diese Stoffwechselstörung nicht geknüpft sein. Der Versuch B läßt keinen Zweifel darüber obwalten, daß auch das durch Kochhitze proteolytisch inaktivierte Präparat die gleiche Wirkung ausübt. Doch sei hier daran erinnert, daß es v. Bergmann[1]) gelungen ist, Tiere gegen die deletäre Wirkung von Pankreasinplantationen auch durch Vorbehandlung mit proteolytisch inaktiviertem Trypsin zu schützen.

Herr Dr. Georg Grübler hatte die Freundlichkeit, uns über direkte Anfrage mitzuteilen, daß seinem Trypsin kein besonderes Konservierungsmittel zugesetzt ist und daß dasselbe nur geringe Mengen eines von dem Herstellungsverfahren herrührenden Neutralsalzes enthält. Fremde Zusätze können also für die beobachtete Stoffwechselwirkung nicht verantwortlich gemacht werden.

Wir wenden uns nunmehr weiter der Frage zu, ob man Grund hat, einen erhöhten Eiweißzerfall und eine Mobilisierung von Gewebsproteiden als Folge der parenteralen Trypsineinführung anzusehen.

Betrachten wir die Phasen der Stoffwechselschwankungen in der Folge der einzelnen Trypsininjektionen und ziehen wir für jede einzelne die N-Bilanz, so ergibt sich:

	Versuch A	Versuch B
nach Injektion von $^1/_2$ g Trypsin	— 0,12 g N	— 1,85 g N
„ „ „ 1 g „	— 0,08 „ „	+ 2,99 „ „
„ „ „ $1^1/_2$ „ „	+ 10,79 „ „	
„ „ „ 2 „ „	+ 7,29 „ „	
„ „ „ proteolytisch inaktiviertem Trypsin	+ 0,79 „ „	— 6,85 „ „
Summe	+ 18,67 g N	— 5,71 g N

[1]) l. c.

Der Versuch A ergibt also allerdings eine Mehrausscheidung von etwa 18 g N über die berechnete Aufnahme von Nahrungsstickstoff. Nun verteilt sich aber diese Mehrausscheidung auf die Breite von 48 Versuchstagen, während deren der aus seiner Ruhelage gebrachte Stoffwechsel sozusagen seine Pendelschwingungen vollführte. Auf einen Tag entfällt hier also nur ein

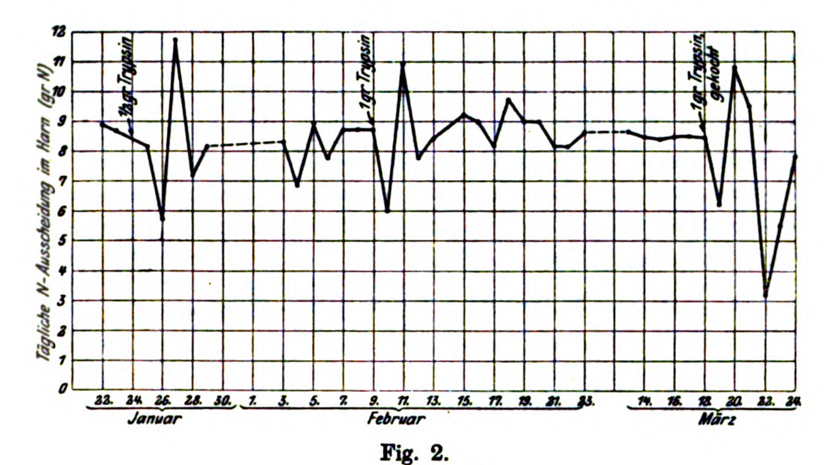


Fig. 2.

Plus von 0,38 g Stickstoff. Es ist dies ein Betrag, der wohl schon innerhalb der Fehlergrenzen liegt (ca. 4 °/₀ des Nahrungsstickstoffes) und sich überdies auch noch insofern verkleinert, als die Gesamtbilanz von 28 Normaltagen, wo sich das Tier im Stickstoffgleichgewicht befand, im Versuch A gleichfalls ein kleines Plus ergibt (+ 4,42 g N in 28 Tagen; i. e. + 0,16 g N pro Tag).

Beachtet man nun weiter, daß das Versuchstier während der langen Zeitdauer des Experiments nicht nur nicht abgemagert ist, sondern sogar um mehr als 1 kg an Gewicht zugenommen hat und daß sich bei dem anderen Stoffwechselversuch nicht nur kein Plus, sondern sogar ein kleines Minus an ausgeschiedenem N ergab, so gelangen wir zur Schlußfolgerung, daß das intraperitoneal injizierte Präparat keinesfalls eine hochgradige Einschmelzung von Organeiweißkörpern bewerkstelligt hat und daß parenteral eingeführtes Trypsin also schwerlich befähigt ist, Gewebsproteide abzubauen.

IV.

Pankreas-Versuche.

Versuch C.

Hündin, 12,3 kg schwer; tägliche Nahrung 350 g Fleisch + 55 g Fett. Da sich die N-Ausscheidung im Kote als außerordentlich konstant erwiesen hatte, wurde auf eine vollständige N-Bilanz verzichtet und nur der Gang der N-Ausscheidung im Harne und ihre Beeinflussung durch intraperitoneale Injektion von Pankreassubstanz studiert. Dem Beginne des Versuches ging, um den Hund zu befähigen, größere Pankreasdosen zu vertragen, eine Vorbehandlung mit Trypsin voraus, und zwar erhielt das Tier

am 3. April 0,5 g Trypsin intraperitoneal,
„ 10. „ 1,0 g „ „
„ 26. „ 1,5 g „ „
„ 5. Mai 2,0 g „ „
„ 24. „ 2,5 g „ „

Datum	Injektion	Gewicht kg	Harn-Menge	Harn-N	Anmerkung
15. Juni		12,3	345	9,482	
16. „		„	220	9,541	
17. „		„	280	9,492	
18. „		12,4	250	9,828	
19. „		„	300	10,153	
20. „		12,3	270	10,361	
21. „		12,1		11,148	
22. „		„	270	10,600	
23. „		„	290	10,712	
24. „		„	300	10,675	
25. „		„		9,996	
26. „	5 g Pankreas intraperitoneal	„		9,800	Hund verweigert das Futter
27. „		„	310	5,012	
28. „		12,0	300	10,432	
29. „		„	340	9,467	
30. „		11,9	420	10,586	
1. Juli		12,0	320	10,460	
2. „		„	350	10,365	
3. „		„	250	4,422	Hungertag!
4. „		„	300	10,339	
5. „		„	450	10,351	
6. „		11,8	350	10,312	
7. „		11,9	320	10,364	

Versuch D.

Hündin, 9,0 kg; tägliche Nahrung: **250 g Fleisch und 40 g Fett. Vorbehandlung mit Trypsin genau wie Hund C und gleichzeitig mit demselben.**

Datum	Injektion	Gewicht kg	Harnmenge	Harn-N	Anmerkung
16. Juni		9,0	200	7,518	
17. „		9,1	220	7,628	
18. „		9,3	200	7,665	
19. „		9,1		7,671	
20. „		„	300	7,698	
21. „	4 g Pankreas intraperitoneal		320	7,625	Hunger
22. „		„	300	3,145	
23. „		9,0	320	7,890	
24. „		8,9	300	7,637	
25. „		„	350	7,878	
26. „	10 g Pankreas intraperitoneal	8,8	340	7,612	Hat Futter verweigert
27. „		8,9	300	3,669	
28. „		„	290	9,098	
29. „		„	340	7,722	
30. „		„	360	6,290	
1. Juli		„	380	7,350	
2. „		8,8	380	6,871	
3. „		„	350	6,515	
4. „		„	?	?	Harn verloren gegangen
5. „		„	360	6,086	
6. „			?	7,584	
7. „		„	370	7,626	
8. „		„	400	7,525	
9. „		„	400	7,482	Hunger
10. „		8,5	?	3,201	
11. „		„	380	7,581	
12. „		„	320	7,404	

Ein Blick auf die Figuren 3 und 4 genügt, um uns darüber Gewißheit zu verschaffen, daß die parenteral in den Organismus mit Trypsin vorbehandelter Hunde eingeführte Pankreassubstanz sicherlich keine vermehrte Liquitation von Gewebseiweiß hervorgerufen hat. Die tiefen Senkungen, welche jeder Injektion gefolgt sind, können einfach, wie der Hungerversuch lehrt, als Folgen sistierter Nahrungsaufnahme gedeutet werden.

Wieso es kommt, daß das Eiweiß der lebenden Gewebszellen der verdauenden Wirkung des parenteral eingeführten Pankreasfermentes zu widerstehen vermag, können wir heute ebensowenig erklären, wie die Tatsache, daß Infusorien in einer

kräftig wirksamen Trypsinlösung leben und gedeihen können, und daß die lebende Darmwand nicht verdaut wird. Bedenken wir aber, daß, wenn in Zirkulation gelangendes Trypsin direkt befähigt wäre, Gewebseiweiß abzubauen, der Ablauf des

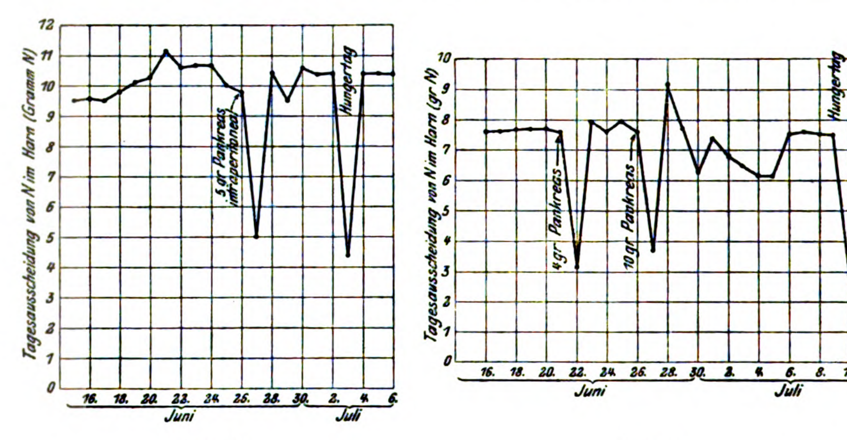


Fig. 3. Fig. 4.

Eiweißstoffwechsels von den Zufälligkeiten der vom Digestionstrakt aus erfolgenden Fermentresorption abhängig sein müßte, so werden wir in der Unfähigkeit des Trypsins, Gewebseiweiß zu mobilisieren, ein Glied in der Kette der „Zweckmäßigkeitseinrichtungen“ des Organismus erkennen.

Zusammenfassung.

Die intraperitoneale Injektion größerer Mengen von Grüblerschem Trypsin stört das Stickstoffgleichgewicht in dem Sinne, daß die Stickstoffausscheidung im Laufe von 1 bis 2 Wochen Unregelmäßigkeiten, bestehend in einer Reihe abwechselnder Erhöhungen und Senkungen, erfährt. Die Gesamtbilanz der Stickstoffausscheidung erfährt jedoch dadurch ebensowenig, wie durch parenterale Einführung von Pankreassubstanz als solcher in den Organismus mit Trypsin vorbehandelter Hunde eine Änderung, welche im Sinne eines erhöhten Eiweißzerfalls und eines gewaltsamen Abbaues der Gewebseiweißkörper gedeutet werden könnte. Die hochgradige Toxizität parenteral eingeführten Trypsins oder Pankreasgewebes kann also keineswegs durch eine unmittelbare Beeinflussung des Eiweißstoffwechsels erklärt werden.

Über die Darstellung, das Verhalten und die quantitative Bestimmung des reinen Urobilins und des Urobilinogens.

Von

D. Charnas.

(Ausgeführt unter Leitung des a. ö. Professors O. v. Fürth im physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 17. Juli 1909.)

I. Einleitung.

Trotzdem bereits 40 Jahre vergangen sind, seitdem Jaffé[1]) das Urobilin zuerst dargestellt hat, gehört das Kapitel der Harnfarbstoffe noch immer zu den dunkelsten der physiologischen Chemie und stoßen wir beim Studium desselben Schritt für Schritt auf Lücken und Widersprüche.

Die Erkenntnis der chemischen Natur und physiologischen Bedeutung des Urobilins ist in erster Linie durch die außerordentlich hochgradige Zersetzlichkeit dieses Farbstoffes behindert worden. So kommt es denn, daß kaum zwei von den Urobilinen, welche verschiedene Untersucher nach abweichenden Methoden und aus heterogenem Materiale dargestellt haben, sich vollkommen untereinander decken.

Auf eine Wiedergabe der außerordentlich umfangreichen Urobilin-Literatur muß hier verzichtet werden, und sei es mir gestattet, in dieser Hinsicht auf die übersichtliche Darstellung in Hamarstens[2]) Lehrbuche, auf die neue Zusammenfassung

---

[1]) Jaffé, Zur Lehre von den Eigenschaften und der Abstammung der Harnpigmente. Virchows Archiv 47, 405, 1869.

[2]) Hamarsten, Lehrbuch d. physiol. Chemie. 6. Auflage, 1907, S. 602 bis 606.

von Fr. Müller[1]), auf die umfangreichen einschlägigen Artikel in Hupperts[2]) Harnanalyse und in Kaysers[3]) Handbuch der Spektroskopie, sowie auf die reichhaltige Dissertation von Thomas[4]) hinzuweisen.

Es dürfte hier genügen, in aller Kürze darauf aufmerksam zu machen, daß das Urobilin von Jaffé, das normale, pathologische und intermediäre Urobilin von Mac-Munn[5]), dasjenige von Eichholz[6]), von Garrod und Hopkins[7]), das α — und β — Urobilin von Saillet[8]), das Hydrobilirubin von Maly[9]), das Sterkobilin usw. keineswegs gleichlautend geschildert werden und noch weniger gilt dies von den „Urobilinoiden", die von einer Reihe von Beobachtern durch Reduktion bzw. Oxydation von Gallenfarbstoffen, Blutfarbstoffen und deren Derivaten teils direkt, teils auf dem Umwege über das Hämopyrrol dargestellt worden sind.

Da die Mehrzahl von Kriterien, wie sie sonst in der Chemie zur Prüfung der chemischen Einheitlichkeit und der Reinheit üblich sind, auf das Harnurobilin, welches nur in sehr geringen Mengen zugänglich ist, keine Anwendung finden konnten, wurde von jeher auf die optische Charakterisierung desselben mit Hilfe der Methoden der Spektralanalyse großer Wert gelegt und das Absorptionsspektrum des Urobilins und seiner verschiedenen Modifikationen eingehend studiert.

Dagegen scheint es bisher an systematischen Versuchen gefehlt zu haben, die Methoden der quantitativen Spektro-

---

1) F. Müller, Die Harnfarbstoffe. Oppenhenheimers Handb. d. Biochem. 1, 736 bis 739, 1909.

2) Huppert, Analyse des Harnes, 10. Aufl. 1898, S. 513 bis 535.

3) H. Kayser, Handb. d. Spektroskopie, 4, 164 bis 172, 1908.

4) K. Thomas, Über Urobilinogen usw. Diss., Freiburg 1907.

5) Mac-Munn, Researches into the colouring matters of human urine etc. Proc. Roy. Soc. 31, 26 und 206, 1881.

6) A. Eichholz, Urobilin and allied pigments. Journ. of Physiol. 14, 326, 1894.

7) A. E. Garrod und F. Gowland Hopkins, On Urobilin. Journ. of Physiol. 20, 112, 1896 und 22, 451, 1898.

8) Saillet, De l'Urobiline dans les Urines normales. Revue de Médecine 17, 109, 1897.

9) Maly, Untersuchungen über Gallenfarbstoffe. Annal. d. Chem. 163, 77, 1872.

photometrie dazu zu verwerten, um ein Urteil über den Wert der nach verschiedenen Darstellungsmethoden erhaltenen Urobilinpräparate zu gewinnen. Bekanntlich bietet uns aber die Bestimmung des Absorptionsverhältnisses eines mit einem wohlcharakterisierten Absorptionsspektrum ausgestatteten Farbstoffes durch Ermittelung des bei einer bestimmten Lösungskonzentration C beobachteten Extinktionskoeffizienten E auf Grund der Relation $C = EA$ ein außerordentlich feines und wertvolles objektives Kriterium seiner Absorptionskraft und seiner Reinheit. Von zwei zu vergleichenden Urobilinpräparaten wird dasjenige als das reinere zu gelten haben, welches ein größeres Extinktionsvermögen und somit das kleinere Absorptionsverhältnis besitzt, daher bereits in geringerer Konzentration die gleiche Extinktion geltend zu machen vermag.

Ich bin daher auf Veranlassung des Herrn Prof. v. Fürth an die Aufgabe herangegangen, auf dem Wege der quantitativen Spektrophotometrie zu ermitteln, welche der bisher beschriebenen Darstellungsmethoden des Urobilins als zweckmäßig gelten dürfen und wie dieselben eventuell in rationeller Weise abgeändert werden könnten.

Auf Grund der gewonnenen Erfahrungen durfte man dann hoffen, zu einer exakten Methode der quantitativen Bestimmung des Urobilins zu gelangen und die gleich zu erörternden Mängel der bisher angewandten Methoden zu vermeiden.

Einige ältere Methoden der Urobilinbestimmung, wie diejenigen von Viglezio[1]), Studensky[2]), Bogomolow[3]), Grimm[4]), Hénocque[5]) und Saillet[6]) beruhten auf der Beobachtung der Schichtendicke oder

---

[1]) Viglezio, Lo sperimentale 1891, S. 235.

[2]) A. Studensky, Petersburger med. Wochensch. 1893, S. 283; Chem. Centralbl. 1893, 2, 668.

[3]) Th. Bogomolow, Die Methoden der quantitativen Bestimmung des Urobilins im Harn. Petersburger med. Wochenschr. 1892, S. 16; Jahresber. f. Tierchem. 22, 538.

[4]) F. Grimm, Über Urobilin im Harn. Virchows Archiv 132, 246, 1893.

[5]) Hénocque, zit. n. Saillet a. o. S. 113.

[6]) Saillet, l. c.

Verdünnung, bei welcher ein bestimmter Farbenton, der Absorptionsstreifen oder die Fluorescenz des Urobilins eben bemerkbar wurde oder verschwand, und konnten daher höchstens eine ganz ungefähre relative Schätzung ermöglichen.

Als quantitative Methoden können eigentlich nur diejenigen von Hoppe-Seyler und Friedr. Müller gelten.

Das Verfahren Hoppe-Seylers[1]) beruhte auf der Aussalzbarkeit des Urobilins mit schwefelsaurem Ammon; der Salzniederschlag wurde mit Alkohol und Chloroform extrahiert und der bei 100° getrocknete Rückstand des Extraktes nach Behandlung mit Äther und Lösen in Alkohol gewogen. Hoppe-Seyler erkannte selbst, daß der Farbstoff „zum Teil verändert" sei. Tatsächlich bestand derselbe aus einem Gemenge bekannter und unbekannter Farbstoffe, unter denen sich, wie bereits Fr. Müller[2]) hervorgehoben hat, namentlich auch das Hämatoporphyrin findet, dessen einschlägige Bedeutung bei der Ausarbeitung des Verfahrens jedoch noch nicht bekannt war.

Das Verfahren von Fr. Müller und Gerhardt[3]) beruht auf dem durchaus richtigen Grundgedanken, daß das quantitativ-spektralanalytische Verfahren die weitaus besten Chancen bietet, um zu einem rationellen Urobilin-Bestimmungsverfahren zu gelangen. Nach Beseitigung etwa vorhandenen Hämatoporphyrins und Gallenfarbstoffes durch alkalische Barytlösung und nach Entfernung des Barytüberüberschusses wurde bei saurer Reaktion mit Ammonsulfat gesättigt, der urobilinhaltige Niederschlag mit schwefelsäurehaltigem Ätheralkohol ausgekocht und der Farbstoffgehalt der Lösung spektrophotometrisch bestimmt, wobei man, da das Absorptionsverhältnis des Urobilins nicht bekannt war, dasjenige des Hydrobilirubins, welches von Vierordt mit 0,0000552 ermittelt worden war, den Berechnungen zugrunde legte.

Zweifellos hat dieses Verfahren einen sehr wesentlichen Fortschritt gegenüber den älteren Methoden bedeutet und dem damaligen Stande der Kenntnisse über das Urobilin durchaus Rechnung getragen. Seit der Ausarbeitung desselben haben aber unsere Kenntnisse auf diesem Gebiete eine wesentliche Erweiterung erfahren und es drängen sich dementsprechend eine Reihe von Bedenken auf, durch welche die Leistungsfähigkeit dieser Methode wesentlich eingeschränkt erscheint.

Zunächst muß hervorgehoben werden, daß einer Übertragung des Absorptionsverhältnisses des Hydrobili-

---

[1]) G. Hoppe-Seyler, Über Ausscheidung des Urobilins in Krankheiten. Virchows Archiv 124, 30, 1891.

[2]) Vgl. Hupperts Analyse des Harnes, 10. Aufl., S. 864.

[3]) D. Gerhardt, Über Hydrobilirubin. Diss., Berlin 1839. Über Urobilin. Zeitschr. f. klin. Med. 32, Heft 3 und 4, 1897. — Vgl. auch Hupperts Analyse des Harnes, 10. Aufl., 1898, S. 861 bis 862.

rubins auf das Urobilin die Annahme von Garrod und Hopkins[1]) entgegensteht, derzufolge das Urobililin und das Hydrobilirubin miteinander nicht identisch und nicht einmal, wie Nencki geglaubt hatte, isomer sein sollen. Von kleineren Abweichungen im spektralen Verhalten und den Reaktionen abgesehen, soll der N-Gehalt des Urobilins 4,02 bis 4,90°/₀, derjenige des Hyrobilirubins dagegen 9,45°/₀ betragen.

Immerhin könnte das Verfahren aber dennoch brauchbare Vergleichswerte liefern.

Es erscheint aber einerseits fraglich, ob durch die Barytfällung Hämatoporphyrin wirklich vollständig beseitigt wird; andererseits wird beim Aussalzen auch ein Teil des Urochroms ausfallen. Dieses wird aber, wie sich herausgestellt hat, durch Behandlung mit heißer verdünnter Schwefelsäure leicht zu braunen Produkten oxydiert, welche gerade in der Gegend des Uroblilinstreifens stark absorbieren, daher sehr störend erscheinen.

Als eine noch schwerer wiegende Fehlerquelle erscheint auf Grund neuerer Untersuchungen die hochgradige Zersetzlichkeit des Urobilins. Schon das Abdestillieren der geringen Äthermengen, welche in einer wässerigen Urobilinlösung nach Chloroformätherextraktion gelöst bleiben, genügt nach Erfahrungen von Garrod und Hopkins, um eine Oxydation des Urobilins zu veranlassen, und muß daher der Äther, statt durch Destillation, durch einen Luftstrom in der Kälte vertrieben werden. Das obige Verfahren erfordert aber eine andauernde Extraktion mit schwefelsäurehaltigem Alkoholäther in der Hitze unter Rückflußkühlung. Bei einem solchen Vorgange erscheint eine Abnahme der Färbekraft des Urobilins unausbleiblich und verschwimmt der sonst ziemlich scharf begrenzte Uroblilinstreifen, derart, daß man bei verschieden langdauernder Einwirkung des Extraktionsmittels auf denselben Urobilinniederschlag bei der spektrophotometrischen Bestimmung zu sehr verschiedenen Resultaten gelangen wird.

Schließlich wird eine dem gegenwärtigen Stande der Urobilinfrage Rechnung tragende Methode auf einen äußerst wichtigen Punkt Rücksicht nehmen müssen, nämlich auf den Um-

---

[1]) l. c.

stand, daß sich die Umwandlung des Urobilin-Chromogens in Urobilin im Harne mit der größten Leichtigkeit vollzieht, derart, daß man bei Untersuchungen physiologischer oder pathologischer Art stets auf die Summe Urobilin + Urobilinogen Rücksicht zu nehmen hat, wenn man zu richtigen Schlußfolgerungen gelangen will.

Bevor ich nunmehr zur Beschreibung meiner Versuche übergehe, mögen die instrumentellen Behelfe Erwähnung finden, mit Hilfe deren ich zu meinen Resultaten gelangt bin.

Zur Feststellung des spektroskopischen Verhaltens und zur Messung der Wellenlängen diente ein Bunsensches Spektroskop mit starker Dispersion, dessen Skala in sorgfältigster Weise auf Grund der Bestimmung von mehr als 120 Linien unter Zuhilfenahme der Gasspektra sowie der Funkenspektra zum Teil seltener Metalle geaicht worden war.

Für die spektrophotometrischen Bestimmungen stand uns zunächst ein Glansches Spektrophotometer von Schmidt & Hänsch in Berlin zur Verfügung, dessen Skala gleichfalls in genauester Weise geaicht wurde.

Der bekannte Übelstand, daß Instrumente dieser Art infolge der hochgradigen (durch die Anordnung des Prismensystems im Spaltrohre bedingten) Lichtabschwächung für Untersuchungen in jener Region, wo der Urobilinstreifen liegt, wenig geeignet sind, vermochten wir durch Anwendung einer sehr starken Lichtquelle zu beseitigen. Wir bedienten uns nämlich einer Nernstlampe, durch deren etwas vergrößertes Bild mit Hilfe einer großen Sammellinse beide Spalthälften gleichmäßig beleuchtet wurden. Wir vermochten so auch bei hohen Farbstoffkonzentrationen scharfe Ablesungen zu erzielen, bei denen unter Anwendung einer Auerlampe an eine Beobachtung gar nicht zu denken war. Wir konnten infolgedessen die Zahl der Einzelmessungen bei variierender Verdünnung, auf Grund deren das Absorptionsverhältnis berechnet wurde, bedeutend erweitern und unseren Werten so einen höheren Grad von Sicherheit verleihen.

Dank der großen Liebenswürdigkeit des Herrn Dozenten Dr. Hans Eppinger, dem wir dafür zu besonderer Erkenntlichkeit verpflichtet sind, stand uns später auch ein Hüfnersches Spektrophotometer modernster Konstruktion (von Albrecht in Tübingen) zur Verfügung. Die Handhabung dieses Instrumentes erscheint dem Glansschen Apparate gegenüber viel bequemer. Doch ergab der Vergleich einer Reihe von Kaliumpermanganat- und Kaliumchromatlösungen unter Verwertung der Vierordtschen Standardzahlen, daß auch das ältere Instrument genaue Bestimmungen ermöglichte, welche mit den mit Hilfe des moderneren Instrumentes ermittelten innerhalb enger Grenzen übereinstimmten.

II. Versuche zur Isolierung des fertigen Harnurobilins.

Es sei mir gestattet, zunächst jene Versuche anzuführen, bei denen wir uns, ohne Rücksicht auf etwa gleichzeitg noch vorhandenes Urobilinogen, das im Harne im fertigen Zustande vorhandene Urobilin zu isolieren und durch Feststellung seines Absorptionsverhältnisses in bezug auf seine Wertigkeit zu charakterisieren bemühten.

1. Versuch. Fällung nach Garrod und Hopkins.

500 ccm urobilin- und urobilinogenhaltigen Harnes wurden bei 38° mit Ammoniumchlorid gesättigt, der Harnsäureniederschlag abfiltriert, das Filtrat mit Ammonsulfat gesättigt, der Niederschlag nach mehrstündigem Stehen auf einem Saugfilter gesammelt, dann in Wasser gelöst, neuerlich durch Sättigung mit Ammonsulfat gefällt und der Aussalzungsvorgang im ganzen 5mal wiederholt. Dabei erwies sich das Filtrat nur das erstemal stark urobilinhaltig (insofern die vollständige Ammonsulfatfällung des Urobilins durch die gleichzeitige Gegenwart von Ammoniumchlorid gehindert worden war); bei den späteren Prozeduren fiel der Farbstoff vollständig aus. Die ersten Filtrationen waren äußerst zeitraubend, da die Filter durch den feinverteilten Niederschlag verstopft wurden. Aus dem letzten Niederschlage wurde der Farbstoff mit absolutem Alkohol in der Kälte ausgezogen, die alkoholische Lösung im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedunstet, der Vorgang noch einmal wiederholt und das in einer Ausbeute von 0,0265 g gewonnene trockne und spröde Präparat spektrophotometrisch ausgewertet.

Bekanntlich hat man eine „saure“ und eine „alkalische“ Modifikation des Urobilins beschrieben. Für die Frage der spektrophotometrischen Bestimmbarkeit des Urobilins erscheint nun eine im Verlaufe dieses Versuches gemachte Beobachtung von großer Wichtigkeit, aus der hervorgeht, daß im Verlaufe der Darstellungsprozeduren die beiden Modifikationen des Urobilins unabhängig von der Reaktion auftreten und ineinander übergehen können.

Der frische Harn zeigte bei starker Verdünnung das Spektrum der „sauren“ Urobilin-Modifikation (d. h. einen Streifen entsprechend $\lambda = 486$ bis 501). Nach der vierten Aussalzung war das Spektrum der „alkalischen“ Modifikation vorhanden (Streifen bei $\lambda = 510 - 518$), trotzdem das Am-

monsulfat an sich neutral war. Während des fünften Aussalzens stellte sich das „saure" Spektrum wieder ein, um nach der ersten Alkoholaufnahme wieder in die alkalische Form überzugehen. Die alkalische Lösung erschien rosa und nach 20 facher Verdünnung mit Wasser gelb, um nunmehr ein doppeltes Spektrum (2 Streifen bei $\lambda = 486$ bis 501 und λ 510 bis 518) zu zeigen. Wurde jetzt mit Essigsäure oder Salzsäure angesäuert, so wurde der saure Streifen stärker und der alkalische schwächer, um schließlich ganz zu verschwinden.

Aus einer Reihe von Beobachtungen ergab sich schließlich ohne Säurezusatz ein Absorptionsverhältnis A = 0 000 1116 bis 0,000 1142, mit Säurezusatz A = 0,000 1056 bis 0,000 1091, welche Werte den Vierordtschen Hydrobilirubinwert (0,000 0552) etwa um das Doppelte übertreffen.

Wir sind nämlich, wie wir vorausschickend bemerken wollen, im Verlaufe unserer Untersuchungen hinsichtlich der Beziehungen des Urobilins zum Hydrobilirubin zu einer mit der Meinung von Garrod und Hopkins nicht ganz übereinstimmenden Auffassung gelangt und behalten uns vor, dieselbe bei einer späteren Gelegenheit zu begründen.

2. Versuch. Extraktionsverfahren von Garrod und Hopkins.

Da Fr. Müller[1]) in seiner neuen Zusammenfassung der Urobilinfrage dieses Verfahren als die beste Methode der Urobilindarstellung bezeichnet, gingen wir bei einem weiteren Versuche dieser entsprechend vor.

2 l eines urobilinreichen Harnes (Vitium) wurden in Arbeit genommen. Der Harn wurde mit Salmiak, das Filtrat mit Ammonsulfat gesättigt, wobei sich ein Brei von Salmiakkrystallen abschied. Nach Ansäuern mit Schwefelsäure wurde mit einer Mischung von 1 Vol. Chloroform und 2 Vol. Äther ausgeschüttelt, der Farbstoff dem Extrakte mit ammoniakhaltigem Wasser entzogen, sodann nach Ansäuern wiederum in Chloroform und daraus neuerlich in verdünntes Ammoniak übergeführt, daraus durch Ansäuern gefällt, mit Chloroform aufgenommen, dieses bei Zimmertemperatur verdunstet, sodann im absoluten Alkohol aufgenommen, im Vakuum eingedunstet und darin über Schwefelsäure zur Gewichtskonstanz getrocknet (0,0410 g).

Spektrophotometrische Bestimmungen ergaben ein Absorptionsverhältnis

A = 0,000 2157 bis 0,000 2360,

also etwa das 4fache des Hydrobilirubinwertes.

---

[1]) l. c. S. 738.

Im Anschlusse an die Methoden von Jaffé und Salkowski[1]) haben wir einige weitere Versuche ausgeführt, um die Isolierung des Harnurobilins auf anderem Wege zu bewerkstelligen.

3. Versuch. Der urobilinhaltige Harn wurde mit Bleiacetat gefällt, der Niederschlag durch Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt, das Filtrat mit Ammonsulfat ausgesalzen, der Niederschlag in Alkohol aufgenommen, die Lösung stark eingeengt, der Farbstoff nach Zusatz von viel Wasser in Chloroform und daraus in verdünntes Ammoniak übergeführt. Das nach dem Eindunsten resultierende Präparat zeigte eine geringe Tinktionskraft, und zwar hatte sich dieselbe speziell beim Erwärmen der alkoholischen und ammoniakalischen Lösung in auffallender Weise vermindert.

4. Versuch. Der Harn wurde mit Ammonsulfat gefällt, der Niederschlag mit heißem Alkohol längere Zeit extrahiert, der Alkohol eingedunstet, der Rückstand der alkoholischen Lösung in einem Gemische von Alkohol und Chloroform aufgenommen, der Farbstoff in verdünntes Ammoniak übergeführt und dieses eingedunstet.

Das Präparat ergab ein Absorptionsverhältnis A = 0,0006268.

5. Versuch. Der Harn wurde mit Bleiacetat gefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt und mit Wasser ausgekocht, das Filtrat mit Ammonsulfat ausgesalzen, die Fällung mit Alkohol in der Kälte extrahiert, der Alkohol im Vakuum verdunstet, der Rückstand in Ammoniak gelöst, mit Schwefelsäure gefällt, der Farbstoff in Chloroform aufgenommen. Das nach dem Eindunsten resultierende Präparat ergab ein Absorptionsverhältnis A = 0,0002185.

Derartige Versuche wurden noch mehrfach unter Anwendung mannigfacher Variationen ausgeführt. Wir übergehen dieselben, da sie uns nur zu der Überzeugung geleitet haben, daß angesichts der außerordentlich großen Empfindlichkeit des Urobilins gegenüber Alkohol, Säuren, Alkalien, Wärmewirkung usw. wenig Aussicht vorhanden war, auf diesem Wege zu einem intakten Präparate zu gelangen. War doch bei allen so gewonnenen Urobilinpräparaten die Extinktion auf einen mehr oder minder kleinen Bruchteil derjenigen des Hydrobilirubins abgesunken.

Der Umstand, daß sich in der Sammlung des Laboratoriums eine kleine Menge eines Originalpräparates von Hydrobilirubin vorfand, das Maly seinerzeit nebst ein-

[1]) E. Salkowski, Über den Nachweis des Peptons im Harn und die Darstellung des Urobilins. Berl. klin. Wochenschr. 1897, 353.

gehender Erläuterung an Ernst Brücke gesandt hatte, bot uns die sehr erwünschte Möglichkeit, den von Vierordt ermittelten Wert für das Absorptionsverhältnis dieser Substanz einer Nachprüfung zu unterziehen.

0,0071 g der Substanz wurden nach 50stündigem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure in 10 ccm absoluten Alkohols gelöst. Die tiefbraune, nicht fluorescierende Lösung zeigte nach entsprechender Verdünnung einen schlecht begrenzten Absorptionsstreifen. Nach Zusatz von ein wenig Salzsäure wurde die Lösung rosenrot, und der Absorptionsstreifen trat nunmehr scharf hervor. Der Extinktionskoeffizient war nach 10facher Verdünnung noch nicht bestimmbar; bei 20facher Verdünnung fand sich E = 0,632 28, woraus sich in sehr guter Übereinstimmung mit dem Vierordtschen Werte (A = 0,000 0551) für Malys Hydrobilirubin ein Absorptionsverhältnis A = 0,000 0561 ergab.

III. Versuche zur Darstellung des Urobilins auf dem Wege seines nativen Chromogens.

Unvergleichlich befriedigender als die Resultate unserer Bemühungen, das bereits im Harne fertig gebildete Urobilin zu isolieren, waren unsere weiteren Versuche, bei denen wir die Darstellung dieses Farbstoffes auf dem Wege seines Chromogens, des Urobilinogens, durchführten.

Versuche in dieser Richtung sind bisher von Saillet[1]) mitgeteilt worden. Dieser entzog das Urobilinogen dem Harne durch Essigäther und führte es sodann durch Belichtung in Urobilin über; dieses wurde mit Wasser ausgeschüttelt, wobei Hämatoporphyrin und andere Farbstoffe unbekannter Art, welche gleichzeitig mit dem Urobilin vom Essigäther aufgenommen worden waren, in diesem zurückblieben. Die so gewonnene wässerige Urobilinlösung wurde dann noch mit Äthyläther geschüttelt und das Urobilin schließlich in Chloroform übergeführt oder ausgesalzen.

Saillet beschrieb zwei Urobilin-Modifikationen, α und β, die durch Alkali- bzw. Säurewirkung ineinander übergingen.

---

[1]) l. c.

Es stellte sich nun bald heraus, daß man bei der Urobilingewinnung auf dem Wege des Urobilinogens weit schonender vorzugehen vermag, als bei der direkten Darstellung.

1. Versuch. Urobilinogenreicher Harn wurde mit Ammonsulfat ausgesalzen, der Niederschlag mit Petroläther im Soxlhetapparat extrahiert, der Auszug im Vakuum eingedunstet, mit heißem Toluol aufgenommen, die Lösung im Lichte eingedunstet, der Rückstand, in dem nunmehr alles Chromogen in Urobilin übergegangen war, mit Eisessig aufgenommen. Nach Verdünnung mit Wasser wurde der Farbstoff mit Ammonsulfat ausgesalzen, getrocknet, durch Extraktion mit Petroläther von krystallinischen Beimengungen unbekannter Art befreit, mit Chloroform aufgenommen und nach Eindunsten im Vakuum getrocknet.

Das Absorptionsverhältnis betrug A = 0,0005735.

Dasselbe war also etwa 10mal größer als dasjenige des Hydrobilirubins, und dürfte dieses ungünstige Ergebnis auf die schädigende Wirkung des Toluols, des Eisessigs und des Chloroforms zurückzuführen sein.

2. Versuch. Urobilinogen-Harn wurde zunächst mit Calciumchlorid gefällt, sodann mit Ammonsulfat ausgesalzen, der Niederschlag mit einem Gemenge von Äther und Petroläther extrahiert, der Extrakt bei 60° eingedunstet und der Rückstand mit Aceton aufgenommen. Der nach Eindunsten des Acetons erhaltene schmierige Urobilin-Rückstand wurde in der Wärme getrocknet und mit Petroläther gewaschen. Absorptionsverhältnis A = 0,0002835.

3. Versuch. Urobilinogenreicher Harn wurde nach Zusatz von Schwefelsäure mit Äther extrahiert, der Ätherextrakt mit verdünntem Ammoniak ausgeschüttelt, die Lösung bei 90° eingedampft und der Rückstand, zur vollständigen Überführung des Urobilinogens in Urobilin wiederholt mit Alkohol eingedunstet.

Die Bestimmung des Absorptionsverhältnisses ergab, nachdem der Alkohol langsam bei Zimmertemperatur eingedunstet worden war, A = 0,0008404. Die Unterlassung letzterer Vorsicht bei einer Parallelprobe ergab eine Verdoppelung des Wertes A = 0,0001845 und bei weiterem Eindunsten mit Chloroform einen Anstieg auf 0,0002384.

4. Versuch. Urobilinogen-Harn wurde nach Eisessigzusatz mit Äther extrahiert, der Äther bei Zimmertemperatur verdunstet, der Rückstand in verdünntem Ammoniak gelöst, der Farbstoff 2mal aus alkalischer Lösung ausgesalzen und in Alkohol aufgenommen. Das Spektrum zeigte die alkalische Modifikation.; A = 0,0001444 und nach Säurezusatz A = 0,0000984.

5. Versuch. Urobilinogen-Harn wurde nach Schwefelsäurezusatz mit einem Gemenge von Äther und Petroläther extrahiert, der nach Eindunsten des Extraktionsmittels gewonnene Rückstand zur Überführung des Urobilinogens in Urobilin mit absolutem Alkohol behandelt und das Urobilin sodann durch Petroläther von fremden Beimengungen befreit. A = 0,0000796.

Das Präparat wurde zum Zwecke weiterer Reinigung mit Eisessig aufgenommen, nach Wasserzusatz ausgesalzen, sodann mit absolutem Alkohol aufgenommen. Das Absorptionsverhältnis hatte sich aber bei diesen Manipulationen nicht nur nicht verbessert, sondern sogar verschlechtert. A = 0,000 1260 (Eisessigwirkung!).

Die im vorstehenden mitgeteilten Versuche hatten uns zur Genüge darüber belehrt, daß nicht nur gröbere Eingriffe, wie Säure- und Alkalieinwirkung in der Wärme, sondern auch die andauernde Einwirkung sog. indifferenter Lösungsmittel für das Urobilin deletär sei. Ja wir beobachteten sogar, daß eine reine wässerige Urobilinlösung beim Stehen im zerstreuten Tageslichte ihr A erheblich ändert. (Im direkten Sonnenlichte kann eine verdünnte wässerige Urobilinlösung binnen wenigen Tagen vollkommen entfärbt werden.)

Wir mußten daher, wenn wir zum Ziele gelangen wollten, noch behutsamer vorgehen, als wir dies bisher getan hatten.

6. Versuch. Urobilinogenhaltiger Harn wurde direkt, ohne Säurezusatz mit Äther extrahiert, die ätherische Lösung von einer geringen darin enthaltenen Farbstoffmenge durch Zusatz von Petroläther befreit. Die nunmehr farblose Lösung wurde im Vakuum eingedunstet, der Rückstand mit verdünntem Ammoniak aufgenommen, die Lösung angesäuert und mit Ammonsulfat ausgesalzen, der Niederschlag mit ein wenig absolutem Alkohol aufgenommen und die Lösung bei 50° im Vakuum eingedunstet.

Das so erhaltene Urobilin ergab ein Absorptionsverhältnis

A = 0,000 0565,

welches mit demjenigen des Hydrobilirubins übereinstimmte.

7. Versuch. Urobilinogenharn wurde nach Säurezusatz mit Äther extrahiert, der Äther eingedunstet, der Rückstand in Ammoniak aufgenommen und zweimal nach Ansäuern mit Ammonsulfat ausgesalzen, sodann in absolutem Alkohol aufgenommen und bei Zimmertemperatur eingedunstet (Vermeidung jeder Erwärmung). A = 0,000 0420.

8. Versuch. Vorgang wie im vorigen Versuche

A = 0,000 0279.

9. Versuch. Urobilinogenreicher Harn. Nach Zusatz von Weinsäure mit Äther ausgeschüttelt; die ätherische Lösung mit

Petroläther ausgefällt; die farblose Lösung eingedunstet, der urobilinhaltige Rückstand in sehr verdünntem Alkohol gelöst, mit Äther ausgeschüttelt, wobei Spuren eines fremden Farbstoffes in den Äther übergingen, das Urobilin jedoch in der wässerigen Schicht zurückblieb. Dieselbe wurde (unter Anwendung der Versuchsanordnung nach Kraft) im absoluten Kathodenvakuum bei niederer Temperatur abdestilliert und der Rückstand über Schwefelsäure getrocknet.

Absorptionsverhältnis A = 0,000 0687.

Zum Zwecke weiterer Reinigung wurde der Farbstoff in reinem Wasser gelöst. Ein schwach gefärbter Rückstand blieb ungelöst. Die Lösung wurde ausgesalzen, der Niederschlag getrocknet, mit absolutem Alkohol aufgenommen, die Lösung im Kathodenvakuum eingedunstet und bei 30° getrocknet.

Absorptionsverhältnis A = 0,000 0330.

10. Versuch. Urobilin- und urobilinogenreicher Harn wurde mit Weinsäure versetzt, mit Äther ausgeschüttelt, die schwach gelbe Lösung gewaschen, nach Wasserzusatz belichtet, die wässerige Urobilinlösung nach längerem Stehen spektrophotometriert, dann im Vakuum bei 38° eingeengt und über Schwefelsäure im absoluten Vakuum getrocknet; (unzweckmäßig! da Schwefelsäure im absolutem Vakuum destilliert). Der schmierige Rückstand wurde in ammoniakalischem Wasser gelöst, ausgesalzen, getrocknet, mit absolutem Alkohol aufgenommen (kein Farbstoffverlust); über Phosphorpentoxyd im absoluten Vakuum getrocknet. Gewicht 0,02.

A = 0,000 020

11. Versuch. Ein urobilinreicher Harn (Carcinomkachexie im letzten Stadium) wurde ohne Säurezusatz mit dem gleichen Volumen Äther ausgeschüttelt, der Ätherextrakt mit Wasser gut gewaschen, der abgehobene Äther bei Zimmertemperatur verdunstet und der urobilinreiche Rückstand mit Wasser bei 38° einige Stunden lang behandelt, wobei das Urobilin allmählich in Lösung ging. Dieselbe wurde zweimal mit reinstem Ammonsulfat ausgesalzen, der Niederschlag mit gesättigter Ammonsulfatlösung gut gewaschen, mit einer sehr geringen Menge absoluten Alkohols aufgenommen und die Lösung im Vakuum über Schwefelsäure verdunstet.

A = 0,000 0178.

12. Versuch. Ein enorm urobilinogenreicher Harn (Lebercirrhose, einen Tag ante mortem entnommen) wurde ohne Säurezusatz mit dem gleichen Volumen Äther extrahiert. (Dabei bleibt der Äther fast ganz farblos, während nach Säurezusatz außer zahlreichen Harnbestandteilen von saurer Natur auch fremde Farbstoffe in den Äther übergehen.) Die ungefärbte ätherische Lösung wurde unter Belichtung bei Zimmertemperatur eingedunstet, der urobilinreiche Rückstand in Berührung mit reinem Wasser bei 38° stehen gelassen, die orangegelbe (bei weiterer Verdünnung rosenrote) Lösung ausgesalzen (wobei das Filtrat fast wasserhell erschien), die Lösung in Wasser und Fällung mit Ammonsulfat noch einmal wiederholt, der orangerote fluorescierende Niederschlag lufttrocken mit absolutem Alkohol aufgenommen.

Die orangegelbe Lösung ergab nach Verdünnung mit Wasser (Gewicht der Substanz 0,0103 g):

E	A
$^{A}/_{125}$ nicht bestimmbar	
$^{A}/_{500}$ = 1,205 14	0,000 017 10
$^{A}/_{1000}$ = 0,603 62	0,000 017 05
$^{A}/_{2000}$ = 0,305 50	0,000 017 25

(Zur Prüfung der deletären Alkoholwirkung wurde noch 2mal mit absolutem Alkohol aufgenommen und im Vakuum eingedunstet; nach dem ersten Male betrug A = 0,000 0196, nach dem zweiten Male A = 0,000 0236.)

Es war uns also gelungen, durch eine äußerst schonende und behutsame Behandlung aus urobilinogenreichen Harnen sehr reine Urobilinpräparate zu gewinnen, die hinsichtlich ihrer relativen Färbekraft nicht nur dem Hydrobilirubin Malys gleichkamen, sondern dieses sogar noch um etwa das Dreifache übertrafen und die als das reinste bisher dargestellte Urobilin angesehen werden dürfen.

Daß sich angesichts der exorbitanten Zersetzlichkeit des Urobilins kein spektrophotometrisches, praktischen Anforderungen genügendes Bestimmungsverfahren auf das Absorptionsverhältnis des unveränderten Farbstoffes als solchen gründen ließ, bedarf nach dem Gesagten keiner weiteren Erläuterung.

IV. Versuche zur Darstellung reinen Urobilins mit Hilfe der alkalischen Harngärung.

Es war uns wiederholt aufgefallen, daß bei längerem Stehen urobilinreicher Harne der Urobilingehalt derselben stark abgenommen hatte, während der Urobilinogengehalt dagegen, auf Grund der Intensität der Farbenreaktion mit dem Ehrlichschen Reagens (Dimethylamidobenzaldehyd) geschätzt, eine bemerkenswerte Zunahme aufwies.

In weiterer Verfolgung dieser Wahrnehmung vermochte ich festzustellen, daß es in einfachster und sicherster Weise gelingt, das Urobilin eines Harnes vollständig in Urobilinogen umzuwandeln, wenn man denselben im Brutofen der alkalischen Harngärung überläßt. Im allgemeinen genügt ein 24stündiges Verweilen im Brutofen, um alles Urobilin zum Verschwinden zu bringen.

Diese Beobachtung zeigte uns einen Weg, um auch aus Harnen, in denen sich das Urobilin bereits fertig gebildet vorfindet, diesen Farbstoff in reiner Form zu isolieren: Es wird die alkalische Harngärung (eventuell durch Zusatz von ein wenig Sediment aus einem gärenden Harne) eingeleitet und, nachdem alles Urobilin verschwunden und in Urobilinogen übergegangen ist, dieses letztere isoliert und nach einer der im vorausgehenden Kapitel erläuterten Methoden in reines Urobilin übergeführt.

Einige Beispiele mögen diesen Vorgang illustrieren:

1. Versuch. $1^1/_2$ l eines urobilinreichen, urobilinogenfreien Harnes wurden bis zur vollständigen Umwandlung des darin enthaltenen Urobilins der Gärung überlassen, sodann mit Weinsäure stark angesäuert. (Wir haben uns nach mannigfachen Versuchen für diese Säure entschieden, da sie, zum Unterschiede von Mineralsäuren, zum mindesten in der Kälte keinen schädlichen Einfluß auf unser Chromogen ausübt und, im Gegensatze zur Oxalsäure, Citronensäure und Essigsäure nicht in den Äther übergeht.) Es wurde mit $^1/_2$ l Äther ausgeschüttelt und die von Blutfarbstoffderivaten u. dgl. stark gefärbte Ätherlösung durch Zusatz des gleichen Volumens Petroläther entfärbt, durch Schütteln mit Wasser gewaschen und unter Belichtung bei Zimmertemperatur eingedunstet. Dabei erfolgte die vollständige Umwandlung des Urobilinogens in Urobilin, und es blieb ein brauner, in

blauen, rosa und violetten Farben schillernder Rückstand zurück. Derselbe wurde in verdünntem Ammoniak gelöst, mit Ammonsulfat ausgesalzen, der Vorgang noch einmal wiederholt und der Farbstoff schließlich in reinem Wasser gelöst.

Das Absorptionsverhältnis wurde mit A = 0,0000261 ermittelt, also immerhin etwas höher, als in obigen Versuchen.

2. Versuch. Ein bluthaltiger, urobilinogenreicher Harn wurde im ganzen wie im vorigen Versuche verarbeitet, das Urobilin aber schließlich statt in Wasser in stark verdünntem Alkohol gelöst und die Lösung mit Äther ausgeschüttelt. Die Farbstoffausbeute war diesmal relativ groß (0,0435 g), das Absorptionsverhältnis A = 0,0000333.

Zum Zwecke weiterer Reinigung wurde der im Vakuum getrocknete Farbstoff 2 Stunden lang bei 38° mit destilliertem Wasser digeriert, das Ungelöste abfiltriert und die Lösung mit Ammonsulfat ausgesalzen. (Im Filtrate blieben nicht unbeträchtliche Mengen eines braunen, spektrumlosen Farbstoffes.) Der Niederschlag wurde wieder in Wasser gelöst. Die Lösung wurde bei 38° eingedunstet und erst nach längerer Zeit wieder in Arbeit genommen. Es wurde in Wasser aufgenommen, ausgesalzen, der Niederschlag in absolutem Alkohol gelöst.

Die spektroskopische Untersuchung ergab nunmehr die „alkalische" Urobilinmodifikation. Salzsäurezusatz bewirkte zwar eine Schwächung des alkalischen und ein Hervortreten des sauren Streifens; doch selbst nach Stunden ergab sich noch ein Absorptionsverhältnis A = 0,0000962, das dreimal so groß war als das früher beobachtete.

Diese und ähnliche Beobachtungen (vgl. auch oben S. 407) mußten uns darüber Klarheit verschaffen, daß für die Feststellung des Absorptionsverhältnisses und damit auch für die spektrophotometrische Bestimmung des Urobilins die Beachtung der beiden labilen Modifikationen desselben, der „sauren" und der „alkalischen", von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Die, wie es scheint, bisher allgemein angenommene Meinung (vgl. z. B. Hupperts Analyse des Harnes, 10. Aufl., S. 521, ff.), daß die Lage der Urobilinstreifen ausschließlich von der Reaktion der Lösung abhängt, ist keineswegs zutreffend.

Unter den zahlreichen Urobilinlösungen, die ich im Verlaufe meiner Untersuchungen zu beobachten Gelegenheit hatte, fand ich nicht allzu selten solche, wo das „alkalische" Spektrum auch nach Zusatz von konzentrierter Salzsäure unverändert blieb und wiederum solche, die ihr „saures" Spektrum auch bei Gegenwart von konzentriertem Ammoniak unverändert behielten. Andererseits können selbst „indifferente" Lösungsmittel das Spektrum verändern. So neigt eine Lösung von

Urobilin in absolutem Alkohol zur Bildung jener Modifikation, bei der beide Streifen gleichzeitig sichtbar sind. Beim Verdünnen kann der eine Streifen verschwinden.

Offenbar handelt es sich um verschiedene Modifikationen (isomere Formen?) des Urobilins. Einer spektrophotometrischen Auswertung einer Urobilinlösung muß stets die genaue Prüfung der Lage der Absorptionsstreifen vorangehen. Nur der wohlbegrenzte Streifen des „sauren" Spektrums gestattet, untereinander vergleichbare Resultate zu gewinnen. Am Rande des Streifens auftretende Schatten müssen sogleich den Verdacht auf einen partiellen Übergang in die alkalische Modifikation erwecken und erscheinen solche Lösungen für die Ermittelung eines richtigen Absorptionsverhältnisses wenig brauchbar.

Eine andere Kategorie von Abweichungen, deren Kenntnis für jeden, der sich mit der Urobilinfrage befassen will, unerläßlich ist, ist die hochgradige Angreifbarkeit des Urobilins sowohl durch oxydative als durch reduktive Agenzien.

Es hat sich herausgestellt, daß eine wässerige Lösung von reinstem Urobilin (A = 0,00001705) sich beim Stehen unter Lichtzutritt verändert, ohne daß sich diese Veränderung äußerlich in auffallender Weise bemerkbar machen würde. Der Streifen des „sauren" Urobilins, der anfänglich noch in einer Verdünnung, bei der die Lösung kaum mehr gefärbt erschien, warnehmbar war, blasst allmählich mehr und mehr ab, derart, daß man schließlich an seiner Stelle selbst in konzentrierten Lösungen nur mehr einen Schatten sieht. Es taucht allerdings gleichzeitig der Streifen des „alkalischen" Urobilins auf, ohne jedoch die ursprüngliche Intensität des sauren Streifens jemals zu erreichen. Bei weiterem Stehen blaßt auch dieser Streifen allmählich ab, und schließlich ist überhaupt kein Absorptionsstreifen mehr zu sehen.

Diese auffallende Veränderung vollzieht sich in absolut-alkoholischer Lösung erheblich schneller. Dabei behält die Lösung ihre rosaviolette Färbung.

Eine wässerige Lösung reinsten Urobilins, deren Spektrum nach langdauerndem Stehen selbst in konzentrierter Lösung nur mehr verwaschene Streifen zeigte, wurde mit Ammonsulfat ausgesalzen und der Niederschlag mit absolutem Alkohol aufgenommen. Die prachtvoll blaurote Lösung wurde mit Essigsäure angesäuert und mit Zinkstaub geschüttelt, worauf sich die Lösung sehr bald vollkommen entfärbte. Wurde nunmehr mit Salzsäure versetzt und etwas erwärmt, so tauchte unter Rosafärbung der Streifen des sauren Urobilins auf und nahm an Intensität schnell zu.

Die farblose Lösung enthält zunächst kein typisches Urobilinogen. Bei stärkerer Reduktion wird aber dieses in allmählich zunehmender Menge durch die Ehrlichsche Reaktion nachweisbar.

Man wird also folgern dürfen, daß das Verschwinden der Streifen in einer wässerigen oder alkoholischen Urobilinlösung bei Luftzutritt an oxydative Vorgänge geknüpft ist und daß aus dem Oxydationsprodukt durch Reduktion auf dem Umwege des Urobilinogens das ursprüngliche Urobilin regeneriert werden könne.

Daß alle die erwähnten Faktoren bei Ausarbeitung einer Methode zur spektrophotometrischen Bestimmung des Urobilins in sorgfältigster Weise beachtet werden müssen und daß die bisher angewandten Methoden, welche auf die Zersetzlichkeit des Urobilins wenig Rücksicht nahmen, keine exakten Resultate liefern konnten, ist einleuchtend.

V. Darstellung und Eigenschaften des Urobilinogens.

1. Entstehung durch alkalische Harngärung. Wie bereits erwähnt, bietet die alkalische Harngärung ein einfaches und sicheres Mittel, um Urobilin in Urobilinogen überzuführen. Es genügt in der Regel, die native saure Reaktion des Harnes durch Zusatz von Ammoniumcarbonat abzustumpfen und denselben während 1 bis 2 Tagen im Brutofen zu belassen, um alles vorhandene Urobilin in Urobilinogen überzuführen.

In urobilinfreien Harnen kommt es bei der Gärung niemals zur Urobilinogen-Bildung, auch nicht bei Gegenwart von Gallenfarbstoffen. Selbst nach monatelanger Gärung verschwindet das Urobilinogen nicht aus dem Harne. Es liegt daher kein Grund vor, eine weitere Zerstörung oder Umwandlung des einmal entstandenen Urobilinogens im Verlaufe des Gärungsprozesses anzunehmen.

Selbst in urobilinreichen Harnen bewirkt die Umwandlung dieses Farbstoffes in sein Chromogen keine sehr merkliche Aufhellung. Anscheinend wird dieselbe durch Neubildung anderer dunkelgefärbter Produkte beim Gärungsvorgange verdeckt. Übrigens ist selbst in urobilinreichen Harnen, wie Vergleichsversuche mit reinen Urobilinlösungen lehrten, die Färbung derselben nur zum geringen Teile dem Urobilin zuzuschreiben.

2. Reduktion des Urobilins auf chemischem Wege. Ich habe zahlreiche Versuche ausgeführt, um die Reduktion des Urobilins auf dem Wege der Harngärung durch einen übersichtlicheren rein chemischen Vorgang zu ersetzen. Doch waren die Ergebnisse wenig befriedigend. Insbesondere erwies es sich vorderhand zum mindesten bei saurer Reaktion als unmöglich, den Vorgang derart zu leiten, daß eine Zerstörung des Urobilinogens durch Überreduktion mit Sicherheit vermieden werden konnte.

Eine solche Überreduktion trat z. B. ein, wenn der urobilinhaltige Harn direkt mit Zinkstaub und Salzsäure behandelt wurde. Bessere Resultate wurden erzielt, wenn der Farbstoff aus dem Harne erst durch Aussalzung mit Ammonsulfat abgetrennt und die Lösung desselben sodann mit Zinkstaub und Essigsäure reduziert wurde. Doch auch in diesem Falle verlief die Reaktion nicht quantitativ.

Hydrazinhydrat, ebenso wie schwefelige Säure erwiesen sich als unbrauchbar. Bei weiteren Versuchen, reines Urobilin durch Jodwasserstoffsäure und Jodphosphonium zu reduzieren, wurden schwankende Resultate erhalten; ebenso auch beim Eintragen von Natrium in eine absolut-alkoholische siedende Urobilinlösung.

Die besten Resultate erzielte ich, wenn ich das aus dem Harne isolierte Urobilin in Natriumbicarbonat löste und die heiße Lösung mit Natriumamalgan behandelte, während gleichzeitig durch einen Kohlensäurestrom für eine Abstumpfung des entstehenden Alkalis Sorge getragen wurde.

Jedoch auch dieser Reduktionsvorgang vollzieht sich keineswegs glatt, vielmehr sehr zögernd im Verlaufe von Stunden und sind meine Versuche, denselben den Zwecken einer quantitativen Bestimmung dienstbar zu machen, noch nicht abgeschlossen.

Wir sehen uns daher vorläufig genötigt, auf den Ersatz der Harngärung durch ein chemisches Reduktionsverfahren zu verzichten.

Irgend ein Unterschied in dem Verhalten des auf dem Wege der chemischen Reduktion oder der Harngärung dargestellten Urobilinogens ist uns nicht aufgefallen.

3. Löslichkeitsverhältnisse des Urobilinogens. Um dem bei alkalischer Reaktion vergorenen Harne sein Urobilinogen durch ein Lösungsmittel zu entziehen, muß derselbe zunächst angesäuert werden.

Als Extraktionsmittel benutzte ich, statt des von Saillet empfohlenen Essigäthers, den Äther. Während sich der Essigäther stark mit Farbstoffen belädt, nimmt der Äther nur ausnahmsweise (bei Gegenwart von Blut- oder Gallenfarbstoffen) eine schwache Färbung an, und gelingt es auch dann stets durch Zusatz des gleichen Volumens Petroläther, alle Farbstoffe zu beseitigen und eine farblose Urobilinogenlösung zu erhalten.

Das Urobilinogen wird vom Äther außerordentlich leicht aufgenommen, derart, daß ein einmaliges Ausschütteln der urobilinogenhaltigen Flüssigkeit genügt, um die Überführung quantitativ zu gestalten.

Zum Ansäuern der zu extrahierenden Flüssigkeit erwies sich mir (an Stelle der früher benutzten Essigsäure) die Weinsäure als besonders geeignet. Dieselbe ist in Äther ganz unlöslich, so, daß kurzdauerndes Schütteln der abgehobenen Ätherschicht mit Wasser genügt, um derselben die Spuren aufgenommener Säure zu entziehen. Auch ist, was besonders wichtig erscheint, bei Anwendung dieser Säure eine schnelle Oxydation oder Zersetzung des Urobilinogens nicht zu befürchten.

Die Trocknung einer ätherischen Urobilinogenlösung ist mit besonderen Schwierigkeiten verbunden, da viele der üblichen Trocknungsmittel (wie der Ätzkalk, das Calciumchlorid, das Phosphorpentoxyd) eine schnelle Umwandlung des Chromogens in Urobilin bewirken.

Im ganzen aber ist eine äther-petrolätherische Urobilinogenlösung relativ haltbar, und erfährt ihr Chromogengehalt, wenn dieselbe bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird, erst im Verlaufe von Wochen eine sehr merkliche Abnahme.

Was im übrigen die Lösungsverhältnisse des Urobilinogens betrifft, nehmen Benzol, Toluol und Petroläther wenig, Schwefelkohlenstoff gar nichts davon aus dem Harne auf.

Die Aussalzung des Urobilinogens durch Ammonsulfat erfolgt sowohl aus mineralsaurer als auch aus alkalischer Lösung quantitativ, aus essigsaurer jedoch unvollständig.

Das Urobilinogen wird aus ätherischer Lösung durch Tierkohle kräftig adsorbiert, und kann letzterer dann das Urobilinogen durch Ammoniakbehandlung allerdings nicht in unveränderter Form, sondern als Urobilin entzogen werden.

Entgegen den Angaben von Huppert[1]) und von Thomas[2])

[1]) l. c., S. 526.
[2]) l. c., S. 27.

ist das Urobilinogen aus saurem oder neutralem Harn durch basisches Bleiacetat quantitativ fällbar und kann dem Niederschlage durch essigsäurehaltigen Alkohol leicht entzogen werden.

4. Die Ehrlichsche Aldehydreaktion. Bekanntlich beruht der Nachweis des Urobilinogens im wesentlichen auf seinem Vermögen, sich mit dem Ehrlichschen Reagens, i. e. einer mineralsäurehaltigen Lösung von p-Dimethylamidobenzaldehyd, unter Bildung eines roten, durch einen charakteristischen Absorptionsstreifen ausgezeichneten Farbstoffes umzusetzen.

Es lag nahe, auf diese schöne Farbenreaktion eine spektrophotometrische Bestimmung des Urobilinogens zu gründen. Selbstverständlich erforderte jedoch ein solcher Versuch ein eingehendes Studium der Bedingungen, unter welchen die Synthese zwischen Urobilinogen und Aldehyd quantitativ verläuft. Es stellte sich bald heraus, daß bei Ausführung der Reaktion in der bisher üblichen Weise von einer quantitativen Umsetzung keine Rede ist, daß vielmehr, um eine solche zu erzielen, gewisse Vorsichtsmaßregeln mit peinlichster Sorgfalt eingehalten werden müssen.

Wird nämlich die Reaktion in der Weise ausgeführt, wie sie zuerst von Ehrlich[1]) angegeben, sodann von Pröscher[2]), Neubauer[3]), Bauer[4]) und anderen (vgl. die Literaturangaben in der Dissertation von Thomas[5]) ausgeführt worden ist, so verläuft sie gleichzeitig nach ganz verschiedenen Richtungen.

Neben der Farbstoffsynthese aus Urobilinogen und Aldehyd vollzieht sich nämlich gleichzeitig unter der Einwirkung der im Reagens enthaltenen Salzsäure eine Oxydation des Urobilinogens zu Urobilin. Es ist dies bereits bei Zimmertemperatur und in noch höherem Grade beim Aufkochen der

---

[1]) P. Ehrlich, Med. Woche 1901, Nr. 15.

[2]) Pröscher, Zur Kenntnis der Ehrlichschen Reaktion. Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 520, 1901.

[3]) O. Neubauer, Über die Bedeutung der neuen Ehrlichschen Farbenreaktion mit Dimethylamidobenzaldehyd. Münch. med. Wochenschr. 1903, 1846.

[4]) R. Bauer, Die Ehrlichsche Aldehydreaktion in Harn u. Stuhl. Centralbl. f. inn. Med. 26, 833, 1905.

[5]) Thomas, l. c.

Probe der Fall, derart daß man dann stets bei spektroskopischer Prüfung neben dem Streifen, welcher dem Aldehydfarbstoff als solchem eigentümlich ist ($\lambda = 567$ bis 652) auch noch den Streifen des Urobilins ($\lambda = 486$ bis 491) auftauchen sieht.

Das Urobilinogen kann jedoch durch Einwirkung starker Mineralsäuren auch noch in anderer Richtung verändert werden, und ich konnte beim Schütteln einer reinen ätherischen Urobilinogenlösung mit starker Salzsäure oder Schwefelsäure die Entstehung eines rotvioletten, spektrumlosen Farbstoffes beobachten.

Es handelt sich nun darum, die Reaktion derart anzustellen, daß diese Nebenreaktionen ausgeschaltet werden. Es gelingt dies in folgender Weise:

An Stelle der bisher üblichen Lösung des Dimethylamidobenzaldehyds in Salzsäure verwende ich eine gesättigte ätherische Lösung des Aldehyds. Diese wird zu der zu prüfenden ätherischen Urobilinogenlösung hinzugefügt und sodann erst wird durch Zusatz einiger Tropfen absoluten, mit trocknem Salzsäuregas gesättigten Alkohols angesäuert. Nunmehr wird die Mischung 3 Minuten lang geschüttelt und erst nach Ablauf dieser Zeit, aber ja nicht früher durch Zusatz von Alkohol verdünnt.

Die Wichtigkeit letzteren Umstandes wurde durch sorgfältig ausgeführte Serienversuche ermittelt. Je 1 ccm einer reinen Urobilinogenlösung wurden mit $^1/_2$ ccm der ätherischen Aldehydlösung und 3 bis 4 Tropfen der alkoholischen Salzsäure versetzt und der Zeitpunkt der Verdünnung zwischen wenigen Sekunden und 30 Minuten systematisch variiert. Die spektrophotometrisch gefundenen Extinktionskoeffizienten, im Bereiche des Absorptionsstreifens beobachtet, boten ein direktes Maß für die Menge des entstandenen Aldehydfarbstoffes. Wurden die Resultate in Kurvenform verzeichnet, wobei die Zeiten als Abszissen, die Extinktionkoeffizienten (relativen Farbstoffmengen) als Ordinaten aufgetragen wurden, so erhielt man eine Kurve von sehr charakteristischem Aussehen: Dieselbe stieg im Bereiche von etwa 2 Minuten steil an, verlief dann in der Zeit zwischen 2 bis 10 Minuten horizontal, um sodann langsam abzusinken.

Ist die Verdünnung mit Alkohol, welche also weder zu früh noch zu spät, sondern etwa nach 3 Minuten langem Schütteln vorgenommen werden soll, einmal erfolgt, so erweist sich der Farbstoff als ziemlich haltbar.

Der Sinn der hier angegebenen Modifikationen ist also der,

daß die zur Einleitung der Reaktion unentbehrliche Mineralsäure nicht gleichzeitig mit dem Aldehyd hinzugefügt wird, dieser vielmehr schon vorher auf das Urobilinogen einzuwirken Gelegenheit hat; daß ferner die deletäre Wirkung einer zu intensiven Säureeinwirkung hintangehalten wird.

Bei sorgfältiger Beachtung obiger Vorschriften verläuft die Farbstoffsynthese tatsächlich quantitativ und wird das (bei dem alten Vorgange unvermeidliche) Auftauchen des Urobilinstreifens niemals beobachtet.

Ich ging nunmehr daran, das Absorptionsverhältnis des Aldehydfarbstoffes in bezug auf Urobilin möglichst genau zu ermitteln, um so die Möglichkeit zu erlangen, durch eine einfache spektrophotometrische Ablesung eine genaue quantitative Bestimmung der in einer Lösung befindlichen Urobilinogenmenge vornehmen zu können.

Versuch a. $1^1/_2$ l eines urobilinogenhaltigen Harnes wurden nach Weinsäurezusatz mit etwa 1 l Äther ausgeschüttelt, die gelbe ätherische Lösung etwas eingeengt, sodann durch Zusatz von Petroläther vom Farbstoff befreit und durch Schütteln mit Wasser gewaschen. Das Volumen der Lösung betrug nunmehr 1200 ccm.

Je 2 ccm der ätherischen Lösung wurden mit 0.3 bis 0,7 ccm einer kaltgesättigten, ätherischen Lösung von Dimethylamidobenzaldehyd und 3 bis 5 Tropfen absolut alkoholischer Salzsäure versetzt, 2 bis 3 Minuten lang geschüttelt, sodann mit einer abgemessenen Menge Alkohols verdünnt und der Extinktionskoeffizient festgestellt.

8 Versuche, mit mannigfachen Variationen unter Einhaltung der bezeichneten Grenzen ausgeführt, ergaben gut übereinstimmende Ablesungen.

55°, 53°, 54°, 57°, 55°, 54°, 55°, 54° und bei doppelter Verdünnung: 72°, 71°. 72°, 70°, 71°, 72°, 73°, 70°.

Zur Bestimmung des in der Gesamtmenge der Lösung enthaltenen Urobilinogenquantums wurde dasselbe nunmehr durch Eindunsten unter Belichtung in Urobilin übergeführt, dieses in wenig Ammoniak aufgenommen, mit Ammonsulfat ausgesalzen, wobei kein Farbstoff verloren geht, mit absolutem Alkohol gelöst und die alkoholische Urobilinlösung im Kathodenlicht-Vakuum eingedunstet. Die Wägung ergab 0,028 g Urobilin.

Daraus wurde unter der Annahme. daß das Urobilinogen bei Umwandlung in Urobilin keine in Betracht kommende Gewichtsveränderung erfahre, die Konzentration der ursprünglichen Urobilinogenlösung C (Gehalt in Gramm in 1 ccm) und endlich, unter Einführung des aus 8 Beobachtungen gefundenen Mittelwertes für den Extinktionskoeffizienten aus der Relation $\frac{C}{E} = A$ das Absorptionsverhältnis berechnet.

Es ergab sich für eine Verdünnung der ursprünglichen Urobilinlösung (enthaltend 0,028 g) auf

1500 ccm	E = 0,97472	A = 0,00001916
3000 „	E = 0.46156	A = 0,00002023
	Mittel	A = 0,00001969

Versuch b. Ein analoger Versuch wurde mit einem Urobilinharne durchgeführt, in dem das Urobilin durch alkalische Gärung in Urobilinogen übergeführt worden war. Der aus dem mit Weinsäure versetzen Harne erhaltene Ätherextrakt wurde eingeengt, mit dem mehrfachen Volumen Petroläther entfärbt, und eine abgemessene Menge desselben wie oben weiter behandelt.

Die einem Harnquantum von 300 ccm entsprechende Urobilinmenge betrug in diesem Falle 0,0435 g.

Es ergab sich, entsprechend einer Verdünnung dieser Urobilinmenge, auf:

1250 ccm E = 1,82822 (Mittel aus 8 Versuchen)
2500 „ E = 0,93190 „ „ 8 „

woraus sich für A ein Mittelwert = 0, 00001860 berechnet.

Versuch c. Weiterer analoger Versuch mit nativem Urobilinogenharn. Vorgang wie früher. Nur wurde beim Trocknen im Kathodenvakuum die Schwefelsäure durch Phosphorpentoxyd ersetzt.

Es ergab sich ein Absorptionsverhältnis:

A = 0,0000142.

Für die Berechnung der Urobilinogenkonzentration aus der Relation C = EA auf Grund der (unter den obigen mitgeteilten Kautelen auszuführenden) Ehrlichschen Reaktion ergibt sich sonach aus den drei mitgeteilten Versuchsreihen:

A = 0,0000197
A = 0,0000186
A = 0,0000142

Die Zahl A = 0,000017 als Mittelwert.

Wenngleich die Genauigkeit des Faktor A = 0,000017 den praktischen Bedürfnissen der Urobilinbestimmung für physiologische und klinische Zwecke genügen dürfte, beabsichtige ich, denselben nach Sammlung geeigneten Versuchsmateriales durch eine größere Anzahl weiterer Versuche einer exakten Nachprüfung und eventuell einer Korrektur zu unterziehen, die allerdings das Schlußresultat der Bestimmungen der Tagesausscheidung von Urobilin höchstens um Milligramme verschieben kann.

5. Darstellung eines vom Urobilinogen unterschiedenen Chromogens aus vergorenem Harne. Das typische Urobilinogen ist eine Substanz von saurem Charakter,

welche nur nach Säurezusatz aus wässeriger Lösung von Äther aufgenommen und der ätherischen Lösung durch alkalihaltiges Wasser mit Leichtigkeit wieder entzogen wird.

Wird nun aber ein urobilinhaltiger Harn mehrere Tage lang der alkalischen Gärung überlassen, wobei alles Urobilin verschwindet und nunmehr bei alkalischer Reaktion mit Äther ausgeschüttelt, so nimmt dieser reichliche Mengen eines Chromogens auf, welches mit Ehrlichschem Reagens eine schöne blauviolette Färbung gibt, vom typischen Urobilinogen jedoch durch eine Reihe von Eigenschaften unterschieden ist.

Der Zusammenhang dieses Chromogens mit dem Urobilinogen ergibt sich einerseits aus dem Umstande, daß ich in urobilinfreiem Harne auch bei langdauernder Gärung niemals das Auftreten dieses Chromogens beobachtet habe. Andererseits habe ich festgestellt, daß ein Harn, dem alles Urobilinogen bei saurer Reaktion mit Äther entzogen worden ist, kein Chromogen mehr enthält. Es gelingt aber nunmehr auch nicht etwa, im Äther dieses Chromogen neben typischem Urobilinogen nachzuweisen. Vielmehr trägt alles im Äther enthaltene Chromogen den Charakter des Urobilinogens, insofern es in seiner Gesamtheit mit Leichtigkeit in reines typisches Urobilin überführbar ist.

Indem ich eine genauere Untersuchung dieses Chromogens und seiner Beziehung zum Urobilinogen, sowie seiner Analogien zu Substanzen der Indolreihe einer eingehenden, die quantitativen Verhältnisse berücksichtigenden Untersuchung vorbehalte, möchte ich mich an dieser Stelle damit begnügen, jene Merkmale, durch welche dieses Chromogen vom Urobilinogen unterschieden ist, kurz zu skizzieren.

a) Seine Aldehydreaktion ist durch einen blauvioletten Farbenton ausgezeichnet. Die spektroskopische Untersuchung ergibt nicht einen einzigen Streifen, wie beim Urobilinogen, sondern zwei Streifen, $\lambda = 519$ bis 539, $\lambda = 550$ bis 570.

b) Während das native Urobilinogen selbst bei Temperaturen bis 300° weder bei saurer noch bei alkalischer Reaktion unzersetzt flüchtig ist, ist dieses Chromogen vollständig und leicht flüchtig. Die Verflüchtigung mit Wasser- und sogar auch mit Ätherdämpfen erfolgt namentlich leicht bei alkalischer, schwerer bei saurer Reaktion.

c) Das Chromogen hat keinen sauren, jedoch auch keinen ausgesprochen basischen Charakter; denn einmal in Äther übergeführt, kann es demselben weder durch säure-, noch durch alkalihaltiges Wasser entzogen werden.

d) Konzentrierte Salzsäure verwandelt es in einen prachtvoll violetten Farbstoff, der sich in seinen Eigenschaften von dem analogen Urobilinogenfarbstoff unterscheidet.

e) Das Chromogen ist sehr haltbar und es gelingt in keiner Weise, dasselbe in Urobilin überzuführen.

Von weiteren Eigenschaften des Chromogens sei hier noch angeführt, daß es eine deutliche Fichtenspanreaktion gibt, von Calciumchlorid gar nicht, von Sublimat und Bleiessig nur unvollständig gefällt wird und durch einen eigentümlichen penetranten Geruch ausgezeichnet ist.

VI. Verfahren zur Darstellung und quantitativen Bestimmung des Urobilins und Urobilinogens.

Es erübrigt nunmehr, das Verfahren zur Darstellung und quantitativen Bestimmung des Urobilins und Urobilinogens, wie es sich auf Grund der im vorstehenden mitgeteilten Beobachtungen und Erfahrungen ergibt, zusammenfassend mitzuteilen.

Das Prinzip desselben ist folgendes: Der urobilinhaltige Harn wird vergoren, angesäuert und ausgeäthert, die Urobilinogenlösung, wenn nötig, durch Petroläther von beigemengtem Farbstoffe befreit. Sodann wird das Urobilinogen entweder direkt mit Hilfe der Ehrlichschen Reaktion quantitativ bestimmt oder durch Belichtung in Urobilin übergeführt, dieses durch Ausssalzung weiter gereinigt und zur Wägung gebracht.

Was nun die genaueren Vorschriften betrifft, dürfte sich folgender Vorgang empfehlen:

500 oder 1000 ccm des urobilinhaltigen, frischen (mit keinem konservierenden Zusatze versehenen) Harnes werden bis zum Eintritt alkalischer Reaktion mit Ammoniumcarbonatlösung versetzt und 1 bis 2 Tage lang im Brutofen belassen. Nunmehr wird der Harn in einem sehr geräumigen, offnen Gefäße durch Zusatz einer gesättigten Weinsäurelösung stark sauer gemacht (heftiges Aufschäumen!) ein etwa ausfallender Nieder-

schlag schnell abgesaugt und die Flüssigkeit mit dem $1^1/_2$ bis 2fachen Volumen Äther ausgeschüttelt (keine Emulsion). Die Ätherschicht wird wiederholt mit einem kleinen Volumen Wassers[1]) gewaschen. Sollte dieselbe stark gefärbt erscheinen (Blutgehalt des Harnes!) so wird das gleiche Volumen Petroläther hinzugefügt und der sich abscheidende Farbstoff durch wenig Wasser entfernt. In der nunmehr nahezu farblosen ätherischen (bzw. äther-petrolätherischen) Urobilinogenlösung kann das Urobilin entweder a) spektrophotometrisch oder b) gewichtsanalytisch bestimmt werden.

Im ersteren Falle wird die Lösung nunmehr in einem Meßzylinder abgemessen und zur Ermittelung des E der Aldehydreaktion folgendermaßen verfahren:

Bei nicht allzu geringem Urobilinogengehalte der Lösung (Harne mit vermehrtem Urobilingehalte) geht man derart vor, daß man 1 oder 2 ccm der Ätherlösung mit 0,2 bis 0,5 ccm einer kaltgesättigten ätherischen Lösung von Dimethylparaamidobenzaldehyd in einem 10 ccm fassenden (mit eingeschlossenem Stöpsel versehenen) Meßzylinder mischt, 2 bis 3 Tröpfchen mit trocknem Salzsäuregas gesättigten absoluten Alkohols hinzufügt und 2 bis 3 Minuten lang kräftig schüttelt. Es wird dann sofort mit einer passenden Menge Alkohols auf ein bestimmtes Volumen verdünnt und die Lösung in den Trog des Spektrophotometers (Schultzescher Trog, ca. 3 ccm fassend) übertragen (Verdünnungsverfahren).

Die Messung erfolgt im Bereiche des dunkelsten Teiles des Absorptionsstreifens (λ 550 bis 570) in der üblichen Weise.

Die Reaktion wird einigemal unter Variation der Konzentration ausgeführt.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel $C = AE$, wo für E der Mittelwert der gefundenen Extinktionskoeffizienten und $A = 0{,}000017$ zu setzen ist. C bedeutet dann das Gewicht Urobilinogen in Grammen, welches in 1 ccm der ätherischen Lösung enthalten war.

---

[1]) In Anbetracht der hochgradigen Zersetzlichkeit des Urobilinogens müssen die Operationen ohne Unterbrechung durchgeführt werden, ist jedes unnötige Schütteln zu vermeiden; auch soll das Waschwasser und die Weinsäurelösung frisch ausgekocht und womöglich der Vorgang bei künstlicher Beleuchtung durchgeführt werden.

Bei sehr geringem Urobilinogengehalt (z. B. bei Verarbeitung normaler Harne) muß man etwas anders vorgehen. 10 ccm der Ätherlösung werden im Meßzylinder mit 0,2 bis 0,3 ccm der gesättigten Aldehydlösung und 2 bis 4 Tröpfchen der alkoholischen Salzsäure versetzt, 2 Minuten geschüttelt und nunmehr eine passende Menge (mindestens 2 ccm) Wasser hinzugefügt. Nunmehr ist der ganze Farbstoff in der wässerigen Schicht enthalten, während der überstehende Äther farblos erscheint und abgegossen wird (Konzentrationsverfahren).

Selbstverständlich gibt das Verfahren die Summe Urobilin + Urobilinogen, in Urobilin ausgedrückt, gestattet jedoch bei Weglassung des Gärungsvorganges auch die isolierte Bestimmung des im Harne vorhandenen Urobilinogens. Für physiologische Zwecke wird dieser Unterschied schwerlich in Betracht kommen.

Beabsichtigt man, das Ergebnis der spektrophotometrischen Messung gewichtsanalytisch zu kontrollieren oder will man von vornherein das Urobilin wägen, so bringt man die ätherische Urobilinogenlösung im Scheidetrichter etwa mit dem gleichen Volumen reinen Wassers zusammen und läßt nun im direkten Sonnenlichte einen Tag lang stehen (Aldehydreaktion prüfen!). Erfahrungsgemäß ist in allen Fällen nach einem Tage im Sonnenlichte alles Urobilinogen in Urobilin umgewandelt, welches beim Umschütteln von Wasser leicht aufgenommen wird (längeres Stehen in der Sonne führt zur Entfärbung des Urobilins). Die wässerige Urobilinlösung wird filtriert, mit reinstem Ammonsulfat in Substanz gesättigt, der Niederschlag auf einem dichten Filter (Schleicher & Schüll, hart Nr. 602) gesammelt, lufttrocken mit möglichst wenig absolutem Alkohol extrahiert, die filtrierte alkoholische Lösung in einem gewogenen Schälchen über Phosphorpentoxyd im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet und der trockene Urobilinrückstand zur Wägung gebracht.

Mit Hilfe dieser Methoden hoffen wir die Frage der Entstehung des Urobilins aus Gallen- und Blutfarbstoffen auf rein chemischem Wege, bei der Organautolyse, sowie am lebenden Tiere studieren, sowie insbesondere das Problem der Resorption und des Kreislaufes des Urobilinogens und der Rolle der Leber bei diesem Vorgange systematisch verfolgen zu können.

Zusammenfassung.

1. Das Urobilin ist nicht nur gegen gröbere chemische Eingriffe, wie Säure- und Alkali-Einwirkung in der Wärme, sondern auch gegen die dauernde Einwirkung sogenannter indifferenter Lösungsmittel, wie Alkohol, Chloroform usw., sowie gegen Belichtung äußerst empfindlich und wird insbesondere seine Färbekraft durch derartige Prozeduren in hohem Grade beeinträchtigt. Die bisher geübte Methode zur spektrophotometrischen Bestimmung des Urobilins, welche auf die Zersetzlichkeit desselben keine ausreichende Rücksicht nimmt, kann daher zu keinen verläßlichen Resultaten führen.

2. Die beiden bisher als „saures“ und „alkalisches“ Urobilin beschriebenen Modifikationen des Farbstoffes erweisen sich tatsächlich als von der Reaktion unabhängig, insofern als erstere auch bei Gegenwart von konzentriertem Ammoniak, das letztere auch bei Gegenwart konzentrierter Salzsäure existenzfähig ist und gehen dieselben leicht ineinander über.

3. Die Reindarstellung und quantitative Bestimmung des Urobilins gelingt nur auf dem Wege des Urobilinogens. Die Überführung des Urobilins in Urobilinogen kann im Harne durch Einleitung der alkalischen Harngärung sehr leicht und anscheinend vollständig bewirkt werden. Dieselbe gelingt auch auf chemischem Wege, und zwar am besten durch Reduktion mit Natriumamalgan in Sodalösung und im Kohlensäurestrome.

4. Durch ein geeignetes Verfahren (Ansäuern des Harnes mit Weinsäure, Ätherextraktion, Beseitigung fremder Farbstoffe durch Petroläther) gelingt es leicht, völlig farblose Urobilinogenlösungen herzustellen.

5. Aus derartigen Lösungen kann durch einen äußerst schonenden Vorgang (Belichtung, Aussalzung, Alkoholbehandlung bei niederer Temperatur, Einengen im Kathodenvakuum) reines Urobilin gewonnen werden.

6. Im Gegensatze zu der bisher gültigen Annahme, daß das von Vierordt für das Hydrobilirubin ermittelte Absorptionsverhältnis (A = 0,000055) auch der quantitativen Bestimmung des Urobilins zugrunde gelegt werden dürfe, ergab sich für reinstes Urobilin ein Extinktionsvermögen, welches

dasjenige des Hydrobilirubins etwa um das Dreifache übertrifft und dementsprechend ein dreimal kleineres Absorptionsverhältnis A = 0,000017.

7. Die quantitative Bestimmung des Urobilinogens gelingt mit Hilfe der Ehrlichschen Farbenreaktion mit Dimethylamidobenzaldehyd auf spektrophotometrischem Wege, jedoch nur unter genauer Einhaltung gewisser (oben beschriebener) Kautelen. Die spektrophotometrische Bestimmung kann durch eine gewichtsanalytische kontrolliert bzw. ersetzt werden, wobei das Urobilinogen durch Belichtung in Urobilin übergeführt und letzteres zur Wägung gebracht wird.

8. Bei der alkalischen Harngärung tritt ein mit dem Urobilinogen in engem Zusammenhange stehendes Chromogen auf, welches sich vom ersteren durch sein spektrales Verhalten bei der Ehrlichschen Reaktion, seine Flüchtigkeit, durch das Fehlen des sauren Charakters, durch das Auftreten eines violetten Farbstoffes bei Einwirkung konzentrierter Säuren, vor allem aber durch seine Stabilität und sein Unvermögen, in Urobilin überzugehen, unterscheidet, dessen Beziehung zum Urobilinogen und zu Chromogenen der Indolreihe jedoch noch genauer untersucht werden soll.

Über Milchsäurebildung im Organismus.
I. Die Milchsäurebildung bei der Autolyse der Leber.

Von

Rudolf Türkel, Wien.

(Ausgeführt unter Leitung des a. ö. Professors v. Fürth im Physiologischen Institut der Wiener Universität.

(Eingegangen am 17. Juli 1909.)

I.

Die Frage, aus welchen Quellen die bei der postmortalen Säuerung der Organe und im Stoffwechsel auftretende Milchsäure stammt, ist noch heute strittig. Während ältere Autoren, gestützt auf die nahe chemische Beziehung zwischen Traubenzucker und Milchsäure, ohne weiteres angenommen hatten, daß die Milchsäurebildung an den Abbau von Kohlehydraten geknüpft sei, mehrten sich in der neueren Literatur die Angaben, denen zufolge auch die Eiweißkörper eine sehr wesentliche Quelle für die Milchsäureproduktion abgeben können.

Liebig[1]) meinte, daß die Rolle, die die Kohlenhydrate bei der Milchsäurebildung spielen, nicht mehr zu bezweifeln sei, während H. H. Meyer[2]) in seinen bekannten Untersuchungen über die Alkalescenz des Blutes den Beweis für die Abstammung der Milchsäure aus den Kohlenhydraten nicht für erbracht hielt und die Möglichkeit betonte, daß auch beim Eiweißabbau Milchsäure entstehen könne. Zu Liebigs Anschauung neigte auch Nasse[3]), der die Kohlenhydrate ausschließlich für die Milchsäurebildung verantwortlich machte, ohne in eine Diskussion darüber einzutreten, ob hierfür auch wirklich Beweise vorliegen. Takacs[4]) betrachtete das Glykogen a priori als die Muttersubstanz der Milchsäure

---

[1]) Liebig, Annal. d. Chem. 62, 383.

[2]) Meyer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 17, 304.

[3]) Nasse, Hermanns Handb. I., 1, 295.

[4]) Takacs, Zeitschr. f. physiol. Chem. 2, 372.

und stellte fest, daß bei Unterbrechung der Zirkulation Glykogen, Zucker und Milchsäure in gleicher Weise vermindert sind. Verdrängung des Sauerstoffs in den untersuchten Extremitäten durch Schwefelwasserstoffgas ergab, daß die Abnahme der drei genannten Stoffe unterblieb, woraus Takacs schloß, daß der Abbau des Glykogens auf oxydativem Wege zur Milchsäure führe. Demant[1]), der die Muskeln hungernder Tauben untersuchte, stellte fest, daß der Milchsäuregehalt der Muskeln bei der Inanition abnimmt. „Die Ursache dieser Erscheinung, sagt er, ist klar: im Hungerzustande verschwindet Glykogen und Zucker aus den Muskeln, und da die Milchsäure bei der Zersetzung dieser Stoffe entsteht, so ist ihre Menge bei hungernden Tauben vermindert." Desto merkwürdiger erschienen ihm andererseits die geringen Differenzen zwischen dem Milchsäuregehalt der Muskeln gefütterter und hungernder Tauben, sowie die hohen Milchsäurewerte, die er bei den letzteren fand. Er folgerte daraus, „daß bei der Bildung der Milchsäure in den Muskeln die Eiweißstoffe wenigstens im Zustande der Inanition beteiligt sind".

Zillesen[2]) fand Milchsäurebildung bei Störung der Zirkulation, insbesondere bei Unterbindung der Arteria hepatica und vermutete, daß die Bildung der Milchsäure mit der verminderten Alkaleszenz des Blutes, bzw. mit einer Schädigung der Leber zusammenhängt.

In einer ganzen Reihe von Arbeiten aus dem Institute von Hoppe-Seyler hat Araki[3]) die Milchsäurebildung bei Sauerstoffmangel und nach verschiedenen Vergiftungen, besonders Phosphorvergiftung, studiert, ohne sich über die Quelle der Milchsäure auszusprechen. Immerhin geht aus seinen Versuchen hervor, daß es sich um Versuchsbedingungen gehandelt hat, bei denen ein gesteigerter Eiweißzerfall vorlag.[4])

Ähnliches in bezug auf die Frage der Beziehung zum Sauerstoffmangel und Eiweißzerfall ergaben die Versuche von v. Frey[5]) und Heffter[6]).

Mandel und Graham Lusk[7]) fanden, daß die Milchsäure aus dem Harn phosphorvergifteter Hunde verschwand, wenn dieselben gleichzeitig mit Phloridzin vergiftet wurden.

Magnus-Levy[8]), der die Milchsäurebildung bei der Autolyse der Leber studierte, ist geneigt, als normale Quelle der Milchsäure die Kohlehydrate anzusehen. Woher die Milchsäure beim glykogenfreien Tier stammt, vermag er nicht zu entscheiden.

---

[1]) Demant, Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 381.

[2]) Zillesen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 387.

[3]) Araki, Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 335, 546; 16, 453; 17, 311; 19, 422. — Hoppe-Seyler, Virchow-Festschr. u. Berliner Ber. 25, 685.

[4]) Vgl. auch Hamarsten, Lehrbuch, 6. Aufl. S. 461.

[5]) v. Frey, Arch f. Anat. u. Physiol. 1885, 533.

[6]) Heffter, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 31, 225.

[7]) Mandel und Graham-Lusk, Amer. journ. of phys. 16, 129.

[8]) Magnus-Levy, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 261.

Harley[1]) fand nach Injektion von Dextrose in Blut und Muskeln, besonders reichlich aber in der Leber Milchsäure. Die Milchsäuresteigerung ging parallel mit dem Zuckerschwunde im Blute.

Berlinerblau[2]) konnte in Durchblutungsversuchen mit Dextrose und Glykogen eine gesteigerte Milchsäurebildung im Muskel nachweisen; er ist demnach geneigt, die Kohlenhydrate als Quelle der Milchsäure anzusehen, ohne die Möglichkeit ganz abzuweisen, daß auch aus Eiweißkörpern Milchsäure entstehen kann.

Ferner fand Marcuse[3]) im Laboratorium Röhmanns im gereizten Muskel weniger Glykogen und mehr Milchsäure als im ungereizten. Wenn er trotzdem die Kohlehydrate nicht als einzige Quelle der Milchsäure anzusehen geneigt ist, so ist dies auf die Versuchsresultate von Böhm[4]) zurückzuführen, der sich zuerst mit Entschiedenheit gegen die Abstammung der Milchsäure aus Kohlehydraten aussprach und zeigen konnte, daß bei der Totenstarre der Milchsäuregehalt erheblich steigt, ohne daß das Glykogen abnimmt.

Asher und Jackson[5]) fanden in Durchblutungsversuchen, daß die Milchsäurebildung der Zunahme löslichen Stickstoffs parallel ging, während das Zuckerblut keinen größeren Milchsäurezuwachs erfuhr, als das Normalblut.

Von großer Wichtigkeit sind auch die Versuche von Minkowski[6]) an entleberten Gänsen, der die Harnsäure im Harn der so operierten Tiere durch Milchsäure ersetzt fand und die größte Menge Milchsäure nach Fleischfütterung, die kleinste im Hunger und nach Kohlenhydratfütterung auftreten sah.

Nebelthau[7]) beobachtete ähnliches bei entleberten Kaltblütern.

Auch Neumeister[8]) sprach sich für die Entstehung der Milchsäure aus Eiweißkörpern aus.

Morishima's[9]) Versuche, bei denen sich infolge von Fäulnis Gärungsmilchsäure neben Fleischmilchsäure bildete, geben ebenso wenig ein eindeutiges Resultat, doch neigt er der Ansicht zu, daß die Fleischmilchsäure aus dem Eiweiß stammt.

Embden[10]) fand, daß in der glykogenfreien Leber bei Durchblutung mit zuckerreichem Blut Milchsäure entsteht; ebenso bei Durchblutung

---

[1]) Harley, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1893, Suppl. S. 45.

[2]) Berlinerblau, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 23, 333.

[3]) Marcuse, Pflügers Arch. 39, 425.

[4]) Böhm, Pflügers Arch. 23, 44.

[5]) Asher und Jackson, Zeitschr. f. Biol. 41, 393.

[6]) Minkowski, Arch. f. experim. Pathol. u. Parmakol. 18, 147; 20, 41; 21, 40; 31, 214.

[7]) Nebelthau, Zeitschr. f. Biol. 25, 123.

[8]) Neumeister, Lehrb. d. physiol. Chem. 1, 253, 1893.

[9]) Morishima, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 43, 217.

[10]) Embden, Centralbl. f. Physiol, 18, 832; vgl. auch v. Noorden und Embden, Centralbl. f. d. Phys. u. Path. des Stoffwechsels 1, 2.

der glykogenreichen Leber mit zuckerarmem Blut. Aber auch bei Durchblutung von glykogenfreien Lebern mit alaninhaltigem Blut fand sich reichlich Milchsäure. Über andere Versuche Embdens, die für die Frage des Ursprungs der Milchsäure von besonderer Wichtigkeit sind, wird unten berichtet werden.

Daß chemische Betrachtungen die Entstehung der Milchsäure aus Eiweißkörpern als durchaus möglich erscheinen lassen, liegt auf der Hand. Bei der Verbreitung des Alanins bzw. des Phenylalanins im Eiweißmolekül, ist es nahe liegend, daran zu denken, daß durch einfache Desamidierung von Alanin Milchsäure direkt entsteht. Tatsächlich haben Neuberg und Langstein[1]) nach Verfütterung von Alanin an Kaninchen nicht nur Glykogenanhäufung in der Leber, sondern auch Milchsäureausscheidung im Harn beobachten können und im Sinne einer Desamidierung des Alanins im Organismus gedeutet. Daß auch bei der Autolyse eine solche Desamidierung der Aminosäuren stattfinden kann, hat Lang[2]) in Hofmeisters Laboratorium gezeigt.

II.

Die Hauptschwierigkeit, die sich der Behandlung aller mit der Physiologie der Milchsäurebildung zusammenhängender Fragen entgegenstellt und die zahlreichen Widersprüche in der vorliegenden Literatur sicherlich in erster Linie verschuldet hat, ist die Methodik der Milchsäurebestimmung und zwar vor allem der Umstand, daß die Zinklactatmethode, zum mindesten in jener Form, wie sie in den Handbüchern beschrieben und von der Mehrzahl der Autoren angewandt worden ist, höchst unverläßliche und untereinander kaum vergleichbare Resultate liefert. Da nun vor kurzem von E. Jerusalem[3]) im Laboratorium v. Fürths ein neues brauchbares Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure ausgearbeitet worden ist, bin ich auf Veranlassung des letzteren an eine neuerliche systematische Bearbeitung der Frage nach dem Ursprunge der Milchsäure im Organismus herangegangen und teile zunächst eine Reihe von Beobach-

[1]) Neuberg und Langstein, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1903, Suppl. S. 514.

[2]) Lang, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 321,

[3]) Jerusalem, diese Zeitschr. 12, 361, 379.

tungen mit, welche sich auf die Milchsäurebildung bei der Leberautolyse beziehen.

Was zunächst die **Versuchsmethodik** betrifft, hielt ich mich durchaus an die von Jerusalem gegebenen Vorschriften und konnte mich von der Brauchbarkeit dieses Verfahrens durch mehrere Übungsanalysen mit abgewogenen Milchsäuremengen überzeugen.

Beispiel: Aus einer Lösung, enthaltend 0,1698 g Milchsäure (in Form des Lithiumsalzes ausgewogen), wurden durch die Analyse 0,162 g Milchsäure wiedergefunden.

Einer mündlichen Mitteilung Embdens an Professor v. Fürth verdanke ich die Kenntnis der Tatsache, daß Embden in frischem Pferdeblute stets Milchsäure gefunden hat. Mit Rücksicht darauf, daß Jerusalem im v. Fürthschen Laboratorium diesen Befund nicht erheben konnte, habe ich neuerlich frisches, geschlagenes Pferdeblut mit der von uns geübten Methode auf Milchsäure untersucht. Ich fand in einer Doppelbestimmung 0,096 bzw. 0,099 g Milchsäure im Liter. Wir können also den negativen Befund Jerusalems nicht aufrecht erhalten und bestätigen die Resultate Embdens.

Die Ausbeute in dem auf S. 388 angeführten Pferdeblutversuche reduziert sich nach diesen Zahlen von 91 auf 84%. Der Wert der Methode wird durch diese Feststellung also nicht beeinträchtigt.

Ich bemerke noch, daß ich, um eine vollständige Extraktion mit Hilfe des in dieser Zeitschrift Band 12, S. 383 beschriebenen Extraktionsapparates zu erzielen, eine Extraktionsdauer von 4 Stunden für nötig fand.

Da bei dem Eindampfen des enteiweißten Organextraktes meist recht voluminöse, fest haftende Rückstände verbleiben, habe ich mich, um das Volumen des zu extrahierenden sauren Breies in geringen Dimensionen zu halten, des Kunstgriffes bedient, die Abdampfschalen mit befeuchteter Watte auszuwischen. Auf diese Weise gelingt es leicht, ohne Verschwendung von Spülflüssigkeit, den Rückstand quantitativ in die Extraktionshülse zu bringen. Die Watte wird natürlich auch in die Hülse übertragen.

Als Material für meine Versuche dienten mir teils aus dem Schlachthause bezogene Rinder- oder Schweinelebern, teils Hundelebern, die dem getöteten Tier frisch entnommen wurden. Da es sich im Laufe der Untersuchungen mehrfach als nötig herausgestellt hatte, an glykogenfreien Lebern zu arbeiten, wurden Hungerhunde durch Adrenalinvergiftung oder durch kombinierte Adrenalin- und Phosphorvergiftung oder endlich durch Phosphorvergiftung allein glykogenfrei gemacht. Besonders mit Hilfe der kombinierten Adrenalin-Phosphorvergiftung erhält man die Lebern in kürzester Frist praktisch glykogenfrei. Die Versuchstiere wurden in Morphium-Halbnarkose durch Entbluten aus der Carotis getötet, ein Teil der Leber zur Glykogenbestimmung nach dem Pflügerschen Verfahren benützt, der Hauptanteil dann in der Schneide- und Zerreibungsmaschine für Organe, Tumoren usw., Modell des Hygienischen

Institutes in Berlin[1]), zerkleinert. Dieser Apparat verwandelt das Organ in eine sehr homogene, dünnbreiige Masse und hält fast alles Bindegewebe zurück, so daß seine Anwendung einen namhaften Fortschritt bedeutet. Der Leberbrei wurde dann in verschiedene Portionen geteilt, die zum Teil sofort verarbeitet, zum Teil unter Zusatz von 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung der aseptischen Autolyse unter Toluol überlassen wurden. Die hier angegebenen Zahlen sind durchwegs auf 100 g Leberbrei umgerechnet worden.

Unser erster Versuch diente einem Vergleiche des Milchsäuregehaltes der autolysierten Leber ohne Zusatz und mit Zusatz von 10% Dextrose. Nach 48stündiger Autolyse fanden sich in der Leber:

1.

	Einzelwerte	Mittel
Ohne Zusatz	0,0912 / 0,0960	Mittel **0,0936** g Milchsäure in 100 g Leberbrei.
Mit Zusatz von 10% Dextrose	0,2820 / 0,3040	„ **0,2930** g „ „ 100 g „ .

Ein weiterer Versuch ergab:

2.

	Einzelwerte	Mittel
Ohne Zusatz nativ	0,1038 / 0,1080	Mittel **0,1059** g Milchsäure in 100 g Leberbrei.
Nach 2 Tagen Autolyse ohne Zusatz	0,4092 / 0,4038	„ **0,4065** g „ „ 100g „
Mit 10% Dextrose	0,5886 / 0,6060	**0,5978** g Milchsäure auf 100 g Leberbrei.
Nach 5 Tagen Autolyse ohne Zusatz	0,2760 / 0,2750	Mittel **0,2755** g Milchsäure in 100 g Leberbrei.
Mit 10% Dextrose	0,3960 / 0,4140	**0,4050** g Milchsäure auf 100 g Leberbrei.

Die Versuche zeigen eine beträchtliche Steigerung des Milchsäuregehaltes bei der Autolyse der Leber und eine Vermehrung der Milchsäure bei Zuckerzusatz. Zugleich lehrt Versuch 2, daß nach einigen Tagen die Milchsäurewerte kleiner geworden sind, was auf eine Zerstörung der Milchsäure hinweist.

Daß die Milchsäure von der überlebenden Leber zerstört wird, hat schon Marcuse[2]) angegeben, doch kann dieser Angabe, da sich Marcuse zum Nachweis der Milchsäure der keineswegs eindeutigen Uffelmanschen Reaktion bediente, nur geringe Beweiskraft zugesprochen werden. Anfängliche Zunahme und nachträgliche Zerstörung der Milchsäure fanden auch Mochizuki und Arima[3]) bei der Autolyse des Stierhodens,

[1]) Katalog der vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Kähler und Martini, Nr. 147.

[2]) Marcuse, l. c.

[3]) Mochizuki und Arima, Zeitschr. f. phys. Chem. 49, 108.

Inouye und Kondo[1]) bei der Autolyse des Muskels und Kikkoji[2]) bei der Autolyse der Milz; auch Hopkins und Fletcher[3]) sowie Frew im Salkowskischen Laboratorium bestätigen diesen Befund für den Muskel.

Dem Studium des zeitlichen Verlaufes der Milchsäurebildung und -Zerstörung diente ein dritter Versuch.

3.

Nativ	0,2872 / 0,2952	Mittel 0,2412 g Milchsäure in 100 g Leberbrei.
Nach 4 Tagen Autolyse	0,6172 / 0,6108	0,6140 g „ „ 100 g „
„ 6 „ „	0,4872 / 0,4670	0,4771 g Milchsäure in 100 g Leberbrei.
„ 8 „ „	0,3372 / 0,4140	0,3756 g „ „ 100 g „
„ 10 „ „	0,2940 / 0,3570	0,3255 g „ „ 100 g „

Ein weiterer Versuch bezog sich auf die Frage, ob der Inosit als Quelle der Milchsäure in Betracht komme.

Über die Möglichkeit, daß auch der Inosit eine Quelle der Milchsäure abgeben könnte, berichtet Gaglio[4]). Auch dieser Autor gibt an, daß Milchsäure im Organismus nicht nur gebildet, sondern auch zerstört wird und hält dafür, daß beide Erscheinungen an das Leben geknüpft sind, da Durchblutungsversuche an toten Organen (Lungen) negativ ausfielen. Daß der Inosit tatsächlich in Milchsäure übergehen kann, haben schon Hilger[5]) und Vohl[6]) gezeigt. Paul Mayer[7]) beschrieb einen rechtsdrehenden Körper, der nach Inositinjektionen im Harn auftrat, über den er jedoch keine genaueren Mitteilungen machen konnte. In einer zweiten Arbeit[8]) fand er nach Verfütterung von 90 g Inosit 1,733 g Gärungsmilchsäure im Harn wieder. Starkenstein[9]) fand, daß bei der Autolyse von Muskel und Leber ein Teil des vorhandenen Inosits aus den Geweben verschwand; gleichzeitig zeigte sich eine Vermehrung der Milchsäure, die durch die Uffelmannsche Reaktion nachgewiesen wurde. Bei der Vergärung des Inosits mit Bacterium coli fand Starkenstein eine ätherlösliche Säure mit schwacher Rechtsdrehung und positiver Uffelmannscher Reaktion. Abgesehen von Hilger haben alle

[1]) Inouye und Kondo, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 481.

[2]) Kikkoji, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 415.

[3]) Hopkins u. Fletcher, Journ. of physiol. 35, 247. — Frew, Zeitschr. f. physiol. Chem 60, 15.

[4]) Gaglio, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1886, 400.

[5]) Hilger, Annal. d. Chem. 160, 333.

[6]) Vohl, Berl. Ber. 9, 984.

[7]) Paul Mayer, diese Zeitschr. 2, 392.

[8]) Derselbe, ibid. 9, 533.

[9]) Starkenstein, Zeitschr. f. experim. Pathol. und Ther. 5, 378.

Autoren, die sich mit der Abkunft der Milchsäure von Inosit beschäftigt haben, inaktive Gärungsmilchsäure gefunden. Den Befund Starkensteins wird man wohl mit Vorsicht deuten müssen, da die Säuremengen, die er gewonnen hat, zu gering waren, um die Substanz chemisch mit Rechtsmilchsäure identifizieren zu können. Daß aber bei wirklich aseptischer Autolyse nur Paramilchsäure und nicht Gärungsmilchsäure entsteht, scheint jetzt insbesondere durch die Untersuchungen der japanischen Autoren wahrscheinlich geworden zu sein.

In einem zur Prüfung der Inositwirkung angestellten Versuche gelang es mir nicht, mich von einer Förderung der Milchsäurebildung durch Zusatz von Inosit zum Autolysengemisch zu überzeugen.[1])

4.

	Ohne Zusatz		Mit 2 % Dextrose	Mit 2 % Inosit
Nativ	0,1590 0,1770	Mittel 0,1680	—	
Nach 3 Tagen Autolyse	1,1240 1,1260	„ 1,1250	1,8836	1,0866 1,0800 } 1,0833 g
„ 6 „ „	0,4338		0,5859	0,5708

Milchsäure in 100 g Leberbrei.

Ich gelange nunmehr zur Besprechung meiner Versuche, die sich auf die Bedeutung des Alanins für die Milchsäureproduktion bezieht.

Jacubasch[2]) fand im Harn bei linealer Leukämie Milchsäure, die er unter Berufung auf Gorup-Besanez auf Alanin bezieht. Ferner hat Embden[3]) jüngst sehr bemerkenswerte Versuche mitgeteilt, auf die ich später noch zurückkommen werde, von denen vorläufig nur so viel erwähnt sei, daß Embden bei Durchblutung der glykogenfreien Leber mit Alanin sehr beträchtliche Milchsäuremengen gewinnen konnte, und zwar größere als bei Zusatz von Traubenzucker. Leucin und Glykokoll erwiesen sich nicht als Milchsäurebildner.

Ich habe mit Kahlbaumschem Alanin gearbeitet. Nachdem ich mich überzeugt hatte, daß bei der in unserem Laboratorium geübten Milchsäurebestimmungsmethode das Alanin nicht in eine ätherlösliche jodoformgebende Substanz über-

---

1) Der Inosit wurde mir von der Gesellschaft für chemische Industrie in Basel freundlichst zur Verfügung gestellt.

2) Jucubasch, Virchows Archiv 43, 196.

3) Embden und Kraus, Verhdl. d. Kongr. f. inn. Med. 1909 in Wiesbaden. Durch die besondere Freundlichkeit des Herrn Dr. Embden, Direktors des physiol.-chem. Institutes in Frankfurt a. M., war ich in der Lage, in den Bürstenabzug seiner Arbeit noch vor der Niederschrift dieser Mitteilung Einsicht zu nehmen, wofür ich ihm meinen besten Dank abstatten möchte.

geführt wird, ging ich bei meinen Versuchen ganz analog vor wie früher. Dabei ergab sich in einem Falle eine sehr beträchtliche Steigerung der Milchsäurebildung in der glykogenhaltigen Leber.

5.

	Ohne Zusatz		Mit 1 g Alanin	
Nativ	0,1440 0,1716	Mittel 0,1578		
Nach 3 Tagen Autolyse	0,2478 0,2476	„ 0,2477	0,5532 0,5968	0,5750 g
„ 7 „ „	0,1902 0,1902	„ 0,1902	1,0470 1,0410	1,0440 g

Milchsäure in 100 g Leberbrei.

Besonders auffallend ist hier der Umstand, daß die Milchsäurezunahme in der Alaninportion noch fortdauerte, als die Milchsäure in der ohne Zusatz angesetzten Portion schon in Abnahme begriffen war.

Dieser Befund erwies sich als inkonstant, wie der folgende Versuch lehrt.

6.

	Ohne Zusatz	Mit 1 g Alanin
Nativ	0,0900	
Nach 4 Tagen Autolyse	0,1806	0,0900 g Milchsäure in 100 g Leberbrei.

Hier war die Milchsäurebildung in der Alaninportion ganz ausgeblieben.

Versuche mit glykogenfreien Lebern ergaben analoge Verhältnisse.

Ein Hund von 12,5 kg Gewicht hungert 2 Tage lang, dann erhält er bei einem Körpergewicht von 10,3 kg 0,005 synthetisches Suprarenin (Tonogen Richter) in 5 ccm Wasser subcutan injiziert; dann hungert er weiter. Am nächsten Tage enthält der Harn 5.17% Traubenzucker. Kein Aceton, keine Acetessigsäure. Gewicht 10,0 kg. Nun erhält er neuerlich 0,005 Suprarenin, das eine neuerliche Zuckerausscheidung von 0,5% zur Folge hat. Am dritten Tage nach Beginn der Suprareninbehandlung, d. i. am fünften Tage seit Beginn des Hungerns, wird der Hund, der jetzt 9,8 kg wiegt und dessen Harn nun zuckerfrei ist, durch Verbluten getötet.

Gewicht der Leber 230 g.

Im enteiweißten Extrakt aus 25 g Leberbrei findet sich kein Traubenzucker. 25 g Leberbrei werden nach Pflüger auf Glykogen verarbeitet. Bei Alkoholzusatz zu der alkalischen Organlösung fällt kein Niederschlag aus.

Milchsäurebestimmung:

7.

	Ohne Zusatz		Mit 1 g Alanin	
Nativ	0,0780 0,0720	Mittel 0,0750		
Nach 4 Tagen Autolyse	0,3564 0,3024	„ 0,3294	0,5880 0,5652	Mittel 0,5766 g

Milchsäure in 100 g Leberbrei.

Aus diesem Versuche lassen sich zwei Tatsachen entnehmen. Erstens ergibt sich, daß **auch in der von Kohlenhydraten** i. e. von Glykogen und Traubenzucker **soweit als möglich befreiten Leber eine reichliche Milchsäurebildung** bei der Autolyse stattfindet, die sich **durchaus im Ausmaße derjenigen Größenordnung bewegt, wie wir sie in glykogenhaltigen Lebern zu sehen gewohnt sind.** Zweitens ergibt sich die Tatsache, daß in glykogenfreien Lebern Zusatz von **Alanin eine nennenswerte Vermehrung der bei der Autolyse entstehenden Milchsäure** mit sich bringen kann.

Diese Befunde stehen vielleicht in einem gewissen Gegensatz zu den zuletzt zitierten Versuchen von Embden, der bei Durchblutung der glykogenfreien Leber keine Zunahme, ja gelegentlich sogar Abnahme der Milchsäure fand. Andererseits findet auch Embden, daß das Alanin einen sehr energischen Reiz für die Milchsäurebildung abgibt. Worauf die Differenz zwischen den Resultaten von Embdens Durchblutungsversuchen und meinen bei der Autolyse gewonnenen Ergebnissen beruht, vermag ich vorläufig nicht zu sagen.

Ein weiterer Versuch, der ganz analog dem in Tabelle 7 mitgeteilten durchgeführt wurde und zum Vergleiche zwischen Dextrose und Alanin dienen sollte, fiel vollständig negativ aus. Die Leber war glykogenfrei.

8.

	Ohne Zusatz		Mit 2% Dextrose		Mit 2% Alanin	
Nativ	0,0960 0,1486	Mittel 0,1223				
Nach 4 Tagen Autolyse	0,1020 0,1516	Mittel 0,1268	0,0840 0,1212	Mittel 0,1026	0,1004 0,1188	Mittel 0,1096g

Milchsäure in 100 g Leberbrei

Ein dritter Versuch wurde an einem Hunde angestellt, der mit synthetischem Suprarenin (Höchst) behandelt und gleichzeitig mit Phosphor chronisch vergiftet worden war. Er erhielt zwei-

mal 0,05 g Phosphor in je 10 ccm Olivenöl gelöst subcutan. Die Leber war stark verfettet und enthielt nur unwägbare Mengen von Glykogen. Die Milchsäurezahlen finden sich in der nächsten Tabelle.

9.

	Ohne Zusatz		Mit 0,5 % Dextrose	Mit 0,5 % Alanin
Nativ	0,0420 0,0448	Mittel 0,0434		
Nach 4 Tagen Autolyse	0,4017 0,3600	„ 0,3808	0,0855	0,4685 g

Milchsäure in 100 g Leberbrei.

Hier ist der geringe Ausschlag der Zuckerportion beachtenswert.

Daß die Adrenalinvergiftung einen Einfluß auf die hier in Betracht kommenden Vorgänge haben könne, scheint aus einem weiteren mit Adrenalin Takamine und Phosphor angestellten Versuche hervorzugehen.

10.

	Ohne Zusatz		Mit 0,5 g Alanin	
Nativ	0,0144 0,0084	Mittel 0,0114		
Nach 4 Tagen Autolyse	0,0420 0,0420	„ 0,0420	0,0420 0,0432	Mittel 0,0426 g

Milchsäure in 100 g Leberbrei.

Die Steigerung der Milchsäurezahlen ist hier eine so minimale, daß sie kaum außerhalb der Fehlergrenzen liegt.

Ich habe deswegen noch einen Versuch angestellt, in welchem ich die Anwendung des Adrenalins ganz vermieden und den Hund nur durch Hunger und Phosphor zur Liquidierung seiner Glykogenbestände gezwungen habe. Die Versuchsergebnisse waren folgende:

11.

	Ohne Zusatz		Mit 0,5 g Dextrose		Mit 0,5 g Alinin	
Nativ	0,0600 0,0600	Mittel 0,0600				
Nach 3 Tagen Autolyse	0,3960 0,3962	Mittel 0,3961	0,1830 0,2220	Mittel 0,2025		
„ 6 „ „	0,2320 0,2510	Mittel 0,2415			0,3050 0,3730	0,3390 g

Milchsäure in 100 g Leberbrei.

Auch hier scheint eine Förderung der Milchsäureproduktion durch Alanin vorgelegen zu haben.

III.

Beim Überblick über meine Versuche gelange ich zu folgenden Ergebnissen:

Zunächst ist festgestellt worden, daß auch eine von (mit den üblichen Methoden nachweisbaren) Zucker- und Glykogenmengen freie Leber bei der Autolyse recht erhebliche Milchsäurequanten zu liefern vermag, und zwar gehörten die in diesem Falle gebildeten Milchsäuremengen derselben Größenordnung an, wie diejenigen, welche unter analogen Bedingungen in glykogenhaltigen Lebern entstehen.

Eine Zunahme der gebildeten Milchsäure beim Zusatz von Inosit wurde nicht beobachtet. Dagegen erwies sich sowohl die Dextrose als auch das Alanin als befähigt, die Milchsäureanhäufung zweifellos zu fördern. Doch war diese Förderung meist keineswegs so groß, daß auch nur annähernd von einer quantitativen Umwandlung des zugesetzten Zuckers oder Alanins in Milchsäure hätte die Rede sein können; in einigen Fällen ist jeder Effekt dieser Zusätze vermißt worden.

Bei unbefangener Betrachtung dieser Verhältnisse drängt sich die Vorstellung auf, daß die Milchsäurebildung bei der Autolyse ebenso wie intra vitam ein vorwiegend intracellulärer Vorgang sein dürfte, und daß die Muttersubstanz der Milchsäure im Zellleibe selbst gelegen sei. Vielleicht macht erst der Protoplasmazerfall jene Verbindung frei, aus welcher die Milchsäure bei der Autolyse entsteht. Eine derartige Vorstellung ist bereits von Asher und Jackson[1]) und Embden[2]) geäußert worden.

Embden macht in seiner bereits mehrfach erwähnten, gemeinsam mit Kraus auf dem letzten Kongreß für innere Medizin veröffentlichten Untersuchung die sehr wichtige Mitteilung, daß frischer Muskelpreßsaft, der völlig frei von Traubenzucker war und Glykogen nur in Spuren enthielt, schon nach einstündigem Stehen reichliche Milchsäurebildung aufwies, auf die der Zusatz von Glykogen, Traubenzucker, Inosit und Alanin ohne jeden Einfluß war. Embden hat daraus den berechtigten Schluß auf die Existenz einer noch unbekannten Vorstufe der Milchsäure in den Muskeln gezogen.

---

[1]) Asher und Jackson, l. c.

[2]) Embden, Verhdl. d. Kongr. f. inn. Med. 1909.

In Übereinstimmung mit den Befunden des genannten Autors glaube auch ich auf Grund der mitgeteilten Versuche, ohne die Vorstellung eines solchen Zellbestandteiles unbekannter Art, der befähigt ist, Milchsäure zu liefern, auch bei meinen Leberautolyseversuchen nicht auskommen zu können. Für die Natur desselben besteht kein Anhaltspunkt, wir wissen nicht einmal, ob er eiweißartiger Natur ist oder nicht.

Um Mißverständnissen vorzubeugen, möchte ich aber ausdrücklich hervorheben, daß es mir ferne liegt, bestreiten zu wollen, daß sowohl der Zucker als das Alanin eine Quelle der Milchsäure bilden können. Zahlreiche gewichtige Argumente, insbesondere aber die Durchblutungsversuche Embdens sprechen für die Annahme, daß mindestens der lebende Organismus sowohl die Milchsäurebildung aus Zucker als auch die Desamidierung des Alanins zu bewerkstelligen vermag.

Eine andere Frage ist allerdings die, ob auch nach Aufhören der Zelltätigkeit sich dieser Vorgang abspielen könne. Wir sehen vorläufig keinen zwingenden Grund zu dieser Annahme, und glauben vielleicht mit der Vermutung auskommen zu können, daß es sich etwa auch dort, wo Zusatz von Zucker oder Alanin die Milchsäurebildung bei der Autolyse gefördert hat, nicht sowohl um direkte Umformung als um indirekte Förderung jenes Spaltungs- oder Umwandlungsvorganges, der die Milchsäure aus einem unbekannten Protoplasmabestandteile entstehen läßt, gehandelt haben könnte.

Auch darf nicht übersehen werden, daß die in einem gegebenen Momente in einem Organe nachweisbare Milchsäure sozusagen die Resultierende zweier entgegengesetzter Prozesse: eines milchsäurebildenden und eines milchsäurezerstörenden darstellt, und daß der Einfluß eines Zusatzes leicht im Sinne der Förderung des ersteren Vorganges imponieren kann, während es sich vielleicht tatsächlich nur um eine Hemmung des letzteren gehandelt hat.

Wir hoffen nunmehr, daß es auf dem Wege von Stoffwechselversuchen gelingen werde, das Milchsäureproblem seiner Lösung um einen Schritt näher zu bringen.

Zusammenfassung.

1. Bei der aseptischen Autolyse der Leber geht neben der Milchsäurebildung eine energische Zerstörung dieser Säure einher, die schon nach einigen Tagen zu einer Abnahme des Milchsäuregehaltes im Autolysengemenge führt.

2. Auch eine praktisch glykogen- und zuckerfreie Leber ist befähigt, bei der Autolyse Milchsäure zu bilden, und zwar nicht in auffallend geringerem Maße als eine solche von normalem Kohlenhydratgehalte.

3. Zusatz von Inosit bewirkte keine Steigerung der Milchsäurebildung. Nach Zusatz von Dextrose und von Alanin wurde in einigen Fällen ein Anstieg des Milchsäuregehaltes des autolysierten Organs beobachtet, in anderen Fällen wurde ein solcher Anstieg jedoch ganz vermißt; im allgemeinen erreichte derselbe keine solche Höhe, daß von einer direkten Umwandlung der Hauptmenge der zugesetzten Substanz in Milchsäure die Rede sein konnte.

4. Die mitgeteilten Versuche, zusammengehalten mit den Erfahrungen anderer Autoren, vor allem aber mit denjenigen Embdens, drängen zu der Annahme der Existenz eines Zellbestandteiles unbekannter Art, welcher die wichtigste Quelle der bei der Autolyse auftretenden Milchsäure bildet.

Über die Isolierung aliphatischer Alkohole.

Von

C. Neuberg und E. Kansky.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Die Abscheidung kleiner Mengen aliphatischer Alkohole ist bei der verhältnismäßig geringen Anzahl krystallisierter Derivate, die von denselben bekannt sind, nicht immer leicht. Das α-Naphthylisocyanat, das vor einiger Zeit von Neuberg und Manasse[1]) sowie von Neuberg und Rosenberg[2]) zum Nachweis von Aminosäuren empfohlen worden ist und sich in vielen Fällen bewährt hat, eignet sich auch zur Charakterisierung der Alkohole. Den Vorteil, den dieses Reagens bietet, besteht darin, daß es durch sein großes Molekulargewicht die Menge der abzuscheidenden Substanz erhöht und der Verbindung ein gutes Krystallisationsvermögen verleiht. Das α-Naphthylisocyanat reagiert mit den Alkoholen, indem durch direkte Addition α-Naphthylurethane entstehen:

$$C_{10}H_7N:CO + HO.R = C_{10}H_7.NH.COOR.$$

Dieselben bilden sich beim gelinden Erwärmen der Komponenten öfter quantitativ, wenigstens bei manchen primären Alkoholen; bei den sekundären und tertiären Alkoholen sind die Ausbeuten meist schlechter. Stets ist für völligen Ausschluß von Wasser Sorge zu tragen.

Bei dem hohen Siedepunkte des α-Naphthylisocyanats kann die Reaktion im offenen, ev. mit kurzem Steigrohr versehenen Reagensglase vorgenommen werden. Meist genügt kurzes Erwärmen, höchstens bis zum beginnenden Sieden, worauf die Reaktion unter Wärmeentwicklung von selbst weiter verläuft.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 2359, 1905.

[2]) Diese Zeitschr. 5, 456, 1907.

Das Urethan fällt vielfach nach kurzem Stehen krystallinisch aus, in anderen Fällen erfordert die Abscheidung mehrere Stunden bis zu einem Tage; die Krystallisation kann durch Reiben mit einem Glasstabe sehr beschleunigt werden, doch tritt sie in den meisten Fällen ohne weiteres ein.

Das Reaktionsprodukt, das sich aus je einem Molekül Alkohol und α-Naphthylisocyanat bildet, wird mit heißem Ligroin ausgekocht; hierbei bleibt eine kleine Menge Dinaphthylharnstoff, dessen Entstehen aus α-Naphthylisocyanat schwer zu vermeiden ist, quantitativ zurück, und aus der heißen, bis zu passender Konzentration ev. eingeengter Ligroinlösung scheidet sich die α-Naphthylcyanatverbindung des Alkohols meistens in prächtigen Krystallen aus.

Im nachstehenden werden die α-Naphthylurethane folgender Alkohole[1]) beschrieben: n-Propylalkohol, Isopropylalkohol, n-Butylalkohol, Isobutylalkohol, sek. Butylalkohol, tert. Butylalkohol, Isoamylalkohol, sek. Amylalkohol, tert. Amylalkohol, opt.-akt. Amylalkohol, n-Heptylalkohol, n-Octylalkohol, Cetylalkohol und Allylalkohol.

Über die α-Naphthylurethane anderer wichtiger Alkohole und Phenole, namentlich zyklicher Verbindungen, wird später berichtet werden.

n-Propyl-α-naphthylurethan.

$$C_{10}H_7 . NH . COO — CH_2 . CH_2 . CH_3.$$

1,4 g Propylalkohol wurden mit 3,4 g α-Naphthylisocyanat in einem vollkommen trockenen Reagensglase zusammengebracht und auf freier Flamme bis zum beginnenden Sieden erwärmt. Das krystallinisch erstarrte Reaktionsprodukt wurde in kochendem Ligroin gelöst und von dem bei der Reaktion in kleiner Menge gebildeten Dinaphthylharnstoff abfiltriert. Beim Erkalten schieden sich schön ausgeprägte lange Tafeln ab, die von der Mutterlauge abgesaugt, mit wenig kaltem Ligroin nachgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurden. Ausbeute 3,7 g, Schmp. 80°. Zur Analyse wurde die Verbindung nochmals aus heißem Ligroin umkrystallisiert.

[1]) Bei den Ausbeuten ist hier zu berücksichtigen, daß zur Ausnutzung des α-Naphthylisocyanats stets ein kleiner Überschuß an Alkoholen angewandt wurde.

Durch Aufarbeiten der Mutterlauge erhält man hier wie in den folgenden Beispielen noch weitere Mengen des Urethans.

0,2235 g Sbst.: 12,4 ccm N (17°, 762 mm).

Ber. $C_{14}H_{15}O_2N$: N = 6,11%. Gef.: 6,42%.

Isopropyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — CH(CH_3)_2$.

1,4 g Isopropylalkohol wurden mit 3,4 g α-Naphthylisocyanat zusammengebracht und bis zu beginnendem Sieden erwärmt. Das entstandene Urethan wurde durch Filtrieren der heißen Ligroinlösung von Dinaphthylharnstoff getrennt. Es schied sich beim Erkalten in glänzenden langen Tafeln aus. Ausbeute 3,3 g, Schmp. 105 bis 106°. In den übrigen organischen Lösungsmitteln äußerst leicht löslich.

0,2548 g Sbst.: 13,8 ccm N (21°, 757 mm);
0,1641 g Sbst.: 0,4448 g CO_2, 0,0997 g H_2O.

Ber. $C_{14}H_{15}O_2N$: C 73,36, H 6,55, N 6,11%.
Gef.: C 73,92, H 7,21, N 6,12%.

n-Butyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — CH_2 . CH_2 . CH_2 . CH_3$.

Aus 1,6 g n-Butylalkohol und 3,4 g α-Naphthylisocyanat. Aus Ligroin spiessige, aus dünnen Tafeln bestehende Krystalle. Ausbeute 4,0 g. Das Urethan erweicht bei 69° und schmilzt bei 71 bis 72°. Leicht löslich in organischen Lösungsmitteln.

0,1728 g Sbst.: 0,4683 CO_2, 0,1097 H_2O.
0,2605 g Sbst.: 14,2 ccm N (19,5°, 748 mm).

Ber. $C_{15}H_{17}O_2N$: C 74,07, H 7,00, N 5,75%.
Gef.: C 73,91, H 7,05, N 6,11%.

Isobutyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — CH_2 . CH(CH_3)_2$.

Aus 1,6 g Isobutylalkohol und 3,4 g α-Naphthylisocyanat. Aus Ligroin feine Nadeln. Ausbeute 2,2 g, Schmp. 103 bis 105°.

0,3029 g Sbst.: 15,0 ccm N (18,5°, 761 mm).

Ber. $C_{15}H_{17}O_2N$: N = 5,75% Gef.: 5,68%.

Sek. Butyl-α-naphthylurethan.

$$C_{10}H_7 . NH . COO — CH\begin{cases} CH_3 \\ CH_2 . CH_3 \end{cases}$$

Aus 1,6 g sek. Butylalkohol und 3,4 g α-Naphthylisocyanat. Aus Ligroin lange Tafeln. Ausbeute 3,9 g, Schmp. 97 bis 98°.

0,2069 g Sbst.: 10,8 ccm N (21°, 759 mm).
Ber. $C_{15}H_{17}O_2N$: N = 5,75%. Gef.: 5,95%.

Tert. Butyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — C(CH_3)_3$.

Aus 1,6 g tert. Butylalkohol und 3,4 g α-Naphthylisocyanat. Aus Ligroin lange Tafeln. Ausbeute 1,7 g, Schmp. 100 bis 101°.

0,2175 g Sbst.: 11,2 ccm N (20°, 754 mm).
Ber. $C_{15}H_{17}O_2N$: N = 5,75%. Gef.: 5,81%.

Isoamyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — CH_2 . CH_2 . CH(CH_3)_2$.

Aus 2,0 g Isoamylalkohol und 3,4 g α-Naphthylisocyanat. Aus verdünntem Alkohol feine dünne Tafeln vom Schmp. 67 bis 68°. Ausbeute 2,2 g.

0,2212 g Sbst.: 11,2 ccm N (17,5°, 768 mm).
Ber. $C_{16}H_{19}O_2N$: N = 5,46%. Gef.: 5,90%.

Opt.-akt. Amyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — CH_2 . CH\langle^{CH_3}_{CH_2 . CH_3}$

Aus 2,0 g opt.-akt. Amylalkohol (99%ig) und 3,4 g α-Naphthylisocyanat. Ausbeute 3,7 g. Aus Ligroin feine Nadeln vom Schmp. 82°.

0,2225 g Sbst.: 10,6 ccm N (19°, 750 mm).
Ber. $C_{16}H_{19}O_2N$: N = 5,46%. Gef.: 5,43%.

Sek. Amyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — CH(CH_2 . CH_3)_2$.

Aus 2,0 g sek. Amylalkohol und 3,4 g α-Naphthylisocyanat. Aus Ligroin Büschel feiner Nadeln vom Schmp. 76 bis 79°.

0,2051 g Sbst.: 10,4 ccm N (21°, 760 mm).
Ber. $C_{16}H_{19}O_2N$: N = 5,46%. Gef.: 5,74%.

Tert. Amyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — C \begin{cases} CH_3 \\ CH_3 \\ CH_2 . CH_3 \end{cases}$

Aus 2,0 g tert. Amylalkohol und 3,4 g α-Naphthylisocyanat. Aus Ligroin lange spießige Krystalle (Tafeln), Schmp. 71 bis 72°.

0,1903 g Sbst.: 9,7 ccm N (21,5°, 757 mm).
Ber. $C_{16}H_{19}O_2N$: N = 5,46%. Gef.: 5,74%.

n-Heptyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — C_7H_{15}$.

Aus 2,5 g n-Heptylalkohol (Kahlbaum) und 3,4 g α-Naphthylisocyanat. Aus Ligroin feine Nadeln vom Schmp. 62°. Ausbeute 3,9 g.

0,2539 g Sbst.: 11,1 ccm N (20°, 757 mm).
Ber. $C_{18}H_{23}O_2N$: N = 4,91%. Gef.: 4,94%.

n-Octyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — CH_2(CH_2)_6 . CH_3$.

Aus 2,0 g n-Octylalkohol und 2,4 g α-Naphthylisocyanat. Aus Ligroin spießige Nadeln. Schmp. 66°. Ausbeute 3,0 g.

0,2024 g Sbst.: 8,4 ccm N (21°, 760 mm).
Ber. $C_{19}H_{25}O_2N$: N = 4,70%. Gef.: 4,72%.

Cetyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — CH_2 . (CH_2)_{14} . CH_3$.

Aus 2,7 g Cetylalkohol und 1,7 g α-Naphthylisocyanat. Aus Ligroin feine Nadeln. Schmp. 81 bis 82°. Ausbeute 3,8 g.

0,3242 g Sbst.: 10,0 ccm N (18,5°, 759 mm).
0,1568 g Sbst.: 0,4549 g CO_2, 0,1399 g H_2O.
Ber. $C_{27}H_{41}O_2N$: C 78,83, H 9,98, N 3,42%.
Gef.: C 79,06, H 9,91, N 3,55%.

Allyl-α-naphthylurethan.

$C_{10}H_7 . NH . COO — CH_2 . CH . CH_2$.

Aus 1,5 g Allylalkohol und 3,4 g α-Naphthylisocyanat. Aus Ligroin große Büschel langgestreckter Tafeln. Ausbeute 3,4 g. Schmp. 109°.

0,2638 g Sbst.: 15,0 ccm N (19°, 760 mm).
0,1543 g Sbst.: 0,4167 g CO_2, 0,0802 g H_2O.
Ber. $C_{14}H_{13}O_2N$: C 74,01, H 5,72, N 6,18%.
Gef.: C 73,70, H 5,77, N 6,50%.

Über die Reduktion von Aminosäuren zu Aminoaldehyden.

Von

C. Neuberg und E. Kansky.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Vor einiger Zeit haben wir mitgeteilt,[1]) daß man die Aminosäuren in Form ihrer Ester zu Aminoaldehyden

$$RR_1C\cdot NH_2 - COOH \longrightarrow RR_1C\cdot NH_2 - CHO$$

reduzieren kann, und darauf hingewiesen, daß diese Umwandlung nach verschiedenen Richtungen ein physiologisches Interesse bietet.

Im folgenden berichten wir über einige Ergänzungen der früheren Angaben und weitere Anwendung der Reaktion.

Die Isolierung der entstandenen Aminoaldehyde selbst bietet bei der Empfindlichkeit der freien Aminoaldehyde vielfach Schwierigkeiten. Einen Weg zur Abscheidung hat vor kurzem E. Fischer[2]) angegeben, der darin besteht, daß man das Reaktionsgemisch nach dem Eindampfen im Vakuum mit Alkohol und Salzsäure behandelt, wobei die Aminoaldehyde in Aminoacetale übergehen. Dieselben können durch fraktionierte Destillation abgetrennt und durch Hydrolyse in Salze der Aminoaldehyde zurückverwandelt werden. Keine Schwierigkeiten bietet es dagegen, die bei der Reduktion der Aminosäuren gebildeten und durch ihr starkes Reduktionsvermögen sich verratenden Aminoaldehyde in Form charakteristischer Derivate zur Analyse zu bringen.

Man kann in ähnlicher Weise vorgehen, wie es bei den mit den Aminoaldehyden verwandten Zuckerarten geschieht,

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 956, 1908.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem Ges. 41, 1019, 1908.

d. h. Verbindungen mit Hydrazinbasen herstellen. Außer den Phenylosazonen haben sich namentlich die p-Nitrophenylosazone bewährt, die unter Abspaltung der Aminogruppe als Ammoniak entstehen; letztere krystallisieren in prächtig roten Nadeln. Zum Teil sind die Aminoaldehyde auch — nach einer früheren Vorschrift von S. Gabriel und G. Pinkus[1]) — mit Alkali und einem Oxydationsmittel (z. B. Mercurichlorid) in die leicht nachweisbaren Pyrazine übergeführt worden.

Reduktion des Glykokollesters.

1. 4,2 g salzsaurer Glykokollester (= 2,25 g Glykokoll) werden in 42 ccm destilliertem Wasser gelöst. Man kühlt in einer gut wirkenden Kältemischung so stark, daß die in einem hohen Zylindergefäß befindliche Esterlösung stets von Eiskrystallen durchsetzt bleibt. Im Laufe von etwa $1^1/_4$ Stunden trägt man 30 g $4{,}6\,^0/_0$iges Natriumamalgan (2 Mol.) in linsengroßen Stücken ein und hält durch allmählichen Zusatz von 6 ccm rauchender Salzsäure stets schwach sauer. Auch bei starker Kühlung entweicht Wasserstoff. Nach dem Aufhören der Gasentwicklung muß die vom Quecksilber abgegossene Flüssigkeit völlig farblos sein; sie reduziert nun stark Fehlingsche Lösung. Die Titration nach Pavy-Kumagawa-Suto ergab $24{,}8\,^0/_0$ Aminoaldehyd.

Aus dieser Aminoaldehyd enthaltenden Flüssigkeit lassen sich leicht größere Mengen des Phenylosazons und des p-Nitrophenylosazons in der früher angegebenen Weise darstellen.

Überführung in Pyrazin.

Die aus 7,0 g salzsaurem Glykokollester (= 3,75 g Glykokoll) erhaltene Lösung wurde nach der Reduktion gemäß der Vorschrift von Gabriel und Pinkus[2]) mit Natronlauge alkalisch gemacht und sofort mit 18 g Sublimat versetzt. Es tritt starke Reduktion ein, die zum Teil bis zum Metall führt. Durch Wasserdampfdestillation erhält man eine Rohpyrazinlösung, aus der sich nach Filtration von ein wenig schwammigem (über-

[1]) S. Gabriel und G. Pinkus, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 2207, 1893.

[2]) a. a. O.

destilliertem) Quecksilber und Neutralisation mit verdünnter Salzsäure auf Zusatz gesättigter Mercurichloridlösung 0,87 g Pyrazin-Quecksilberchlorid, $C_4H_4N_2 . 2HgCl_2$, abschied. Gabriel und Pinkus (l. c.) erhielten aus 6,0 g reinem salzsaurem Aminoacetaldehyd 2,2 g Pyrazinquecksilberchlorid, L. Wolff[1]) gewann aus dem Acetal derselben Verbindung 18 bis 20%.

Die obige Menge Quecksilberverbindung wurde von neuem mit Natronlauge destilliert und das Destillat in schwach salzsaurer Lösung mit Goldchlorid gefällt; es resultierten 0,6 g Pyrazingoldchlorid, das aus heißem Wasser umkrystallisiert wurde und dann bei 202° schmolz.

0,1035 g Sbst. lieferten 0,0531 g Au.

0,1566 g Sbst.: 9,8 ccm N (18°, 757 mm).

$C_4H_4N_2 . AuCl_3$. Ber. Au 51,30, N 7,33%.
Gef. Au 51,24, N 7,16%.

Behufs Gewinnung weiterer Anhaltspunkte für die Beurteilung der Ausbeute wurden 4,2 g salzsaurer Glykokollester mit 40 g Amalgam von 4,6% reduziert und die resultierende Lösung bei 35° im Vakuum völlig eingeengt. Nach Zusatz von 75 ccm absolutem Alkohol wurde nochmals in vacuo bis zur Trockne verdampft und der Rückstand viermal mit je 60 ccm siedendem, absolutem Alkohol ausgezogen. Es hinterblieb reines Kochsalz; die vermischten Auszüge wurden im Vakuum auf 15 ccm konzentriert, wobei bereits die Ausscheidung von Glykokollesterchlorhydrat begann. Um letzteres quantitativ zu erhalten, wurde nach den dafür von Emil Fischer[2]) gemachten Angaben verfahren, d. h. von neuem verestert usw. Dabei erstarrte das Gemisch, und nach 24 Stunden erhielt man durch Absaugen[3]) und Waschen mit Alkohol-Äther 2,2 g Glykokollesterchlorhydrat, d. h. etwas mehr als die Hälfte, in rein weißen Nadeln zurück. Berücksichtigt man dieses Ergebnis, so ist ersichtlich, daß von dem wirklich in Reaktion getretenen Gly-

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 1830, 1893.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 227, 1902.

[3]) Das Filtrat reduzierte nach dem Verdünnen und Neutralisieren noch die Fehlingsche Lösung. Verdünnt man mit Alkohol, so verschwindet das Reduktionsvermögen beinahe vollständig, um nach dem Kochen mit wässerigen Mineralsäuren zurückzukehren.

kokollester nach dem Ausfall der Titration sowie des Pyrazinversuches etwa 50% in Aminoaldehyd umgewandelt worden sind.

Benzoylverbindung des Aminoacetaldehyds.

Eine an sich aussichtsvolle Methode, den Aminoaldehyd zu isolieren, bestand darin, ihn nach Schotten-Baumann zu benzoylieren. Hierbei mußte unveränderter Ester zu Glykokoll verseift und in leicht lösliches hippursaures Natrium verwandelt werden, während nach Analogie mit den Zuckerarten und mit dem Glucosamin für den Aminoaldehyd der Übergang in ein in Alkali unlösliches Benzoylderivat wahrscheinlich war. Das letztere bildet sich in der Tat und zeigt die erwarteten Eigenschaften; allein es war unmöglich, dasselbe in krystallisiertem Zustande zu gewinnen oder auch durch Umfällung in analysenreiner Form zu erhalten. Bemerkenswerterweise zeigt dasselbe kein Reduktionsvermögen, kann also nicht die unveränderte Aldehydgruppe enthalten. Es gleicht also auch in dieser Beziehung den Perbenzoaten der Zuckerarten und des Glucosamins und leitet sich wahrscheinlich von einer Enolform des Aminoaldehyds ab, für deren Existenz auch schon von C. Harries und Reichard[1]) Argumente angeführt sind; übrigens dürfte nach den neueren Ergebnissen von Semmler[2]) ein solches Vorkommen von Enolformen der Aldehyde nichts ungewöhnliches sein. Daß in der Benzoylverbindung ein Abkömmling des Aminoaldehyds vorliegt, geht auch daraus hervor, daß die Substanz beim Erhitzen mit Salzsäure reichlich Benzoesäure abgibt und ein die Fehlingsche Lösung nunmehr stark reduzierendes Produkt liefert. Wie Emil Fischer[3]) früher gefunden hat, wird Aminoacetaldehyd durch Kochen mit verdünnten Mineralsäuren sehr leicht zerstört, so daß Aminoacetaldehyd aus dem Benzoat nicht regeneriert werden konnte. Versucht man, das Benzoylprodukt des Aminoacetaldehyds statt aus reduziertem Glykokollester aus reinem Aminoacetaldehydchlorhydrat (aus Aminoacetal) darzustellen, so sind die Ergebnisse nicht besser; denn auch hier gelang die Darstellung eines krystallisierten Produktes nicht.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 37, 612, 1904.
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 1161, 1909.
[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 92, 1893.

7,0 g Glykokollester-Chlorhydrat werden in 70 ccm Wasser gelöst, mit 75 g 4,6%igem Natriumamalgam reduziert und durch allmähliches Hinzufügen von 15 ccm rauchender Salzsäure immer schwach sauer gehalten. Das Reaktionsprodukt wurde vom Quecksilber abgegossen, mit Natronlauge neutralisiert, mit 21 g Benzoylchlorid und 20 ccm 30%igem NaOH abwechselnd versetzt, so daß die Reaktion stets schwach alkalisch blieb. Dabei schied sich ein zähes, halbfestes Produkt ab. Dasselbe wurde abfiltriert, aus der Schüttelflasche herausgespült und bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion mit Wasser ausgewaschen. Der auf dem Filter befindliche Teil sowie der an den Wänden der Flasche haftende wurde in heißem Alkohol gelöst und filtriert, wobei etwas Kochsalz zurückblieb. Nach dem Verdampfen des Alkohols auf dem Wasserbade wurde der zähe sirupöse Rückstand (3,5 g), der in Aceton, Essigäther sowie in heißem Toluol leicht löslich, in Wasser und Äther unlöslich war, in Benzol aufgenommen und mit Petroleumäther gefällt. Hierbei schied sich die Benzoylverbindung in schwach gelb gefärbten Flocken aus, die nach dem Absaugen und Trocknen über Schwefelsäure ein feines lockeres Pulver darstellten. Die verdünnte alkoholische Lösung war ohne Einwirkung auf Fehlingsche Flüssigkeit. Nach dem Erhitzen mit Salzsäure schied sich Benzoesäure ab, und die davon abfiltrierte Lösung reduzierte nunmehr stark die Fehlingsche Mischung.

Kondensationsversuche mit Aminoacetaldehyd durch Ätznatron.

Orientierende Versuche mit reinem Aminoacetaldehydchlorhydrat haben gezeigt, daß man durch Behandlung mit Ätzalkali zu einem eigentümlichen Kondensationsprodukte des Aminoaldehyds gelangen kann; da dasselbe in Wasser unlöslich ist, so konnte man hoffen, auf die Gewinnung dieses Kondensationsproduktes ein Verfahren zur Abscheidung des Aminoaldehyds aus den Reduktionsprodukten des Glykokollesters zu gründen. Bekannt ist die große Empfindlichkeit des Aminoacetaldehyds gegen Erwärmen mit Alkalien; er erleidet dabei eine völlige Zersetzung unter Dunkelfärbung und Ammoniakabspaltung.

E. Fischer[1]) hat bereits beobachtet, daß Aminoaldehyd

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 95, 1893.

mit konzentriertem Barytwasser eine Gallerte bildet, die sich in warmem Wasser wieder auflöst. Etwas anders verhält sich die Lösung von salzsaurem Aminoacetaldehyd gegen verdünnte Natronlauge.

Versetzt man eine etwa 5%ige wässerige Lösung des Aminoacetaldehydchlorhydrats mit so viel Natronlauge, daß die Flüssigkeit 2% NaOH enthält, so erfolgt alsbald Braunfärbung und reichliche Ausscheidung von kompakten Klumpen des Kondensationsproduktes. Die Flüssigkeit büßt sehr rasch an ihrem Reduktionsvermögen ein; in zwei Tagen ist es bereits verschwunden. Das Kondensationsprodukt setzt sich in groben Flocken zu Boden, die das Aussehen von Ferrihydroxyd besitzen. Die Substanz wurde im Mörser verrieben, mit Wasser wiederholt angerührt und dekantiert, dann auf ein Filter gebracht und mit Wasser so lange gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr alkalisch reagierte, schließlich mit Alkohol und Äther behandelt. Das so dargestellte Produkt bildet eine voluminöse amorphe Substanz, die in allen Lösungsmitteln vollkommen unlöslich ist. Selbst Mineralsäuren wirken in der Kälte kaum ein, beim Erhitzen, z. B. mit Salzsäure, geht sie jedoch teilweise in Lösung; dieselbe zeigt starkes Reduktionsvermögen. Läßt man das Kondensationsprodukt mehrere Tage im Vakuum über Schwefelsäure stehen, so schrumpft es stark zusammen und verwandelt sich in eine schwarze körnige Masse, die durch besondere Härte ausgezeichnet ist und auch beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure nur schwach angegriffen wird.

Dieses Kondensationsprodukt entsteht bemerkenswerterweise ohne merkliche Abspaltung von Ammoniak aus dem Aminoacetaldehyd. Es ist demgemäß stickstoffhaltig:

0,2122 g Substanz: 0,3189 CO_2, 0,1470 H_2O.

0,1157 g Substanz lieferten bei einer Kjeldahlbestimmung NH_3 entsprechend 19,8 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 0,2779 g N.

Gef. C = 41,04 H = 7,69, N = 23,96%.

Diese Zahlen stimmen ganz gut für einen polymeren Aminoacetaldehyd $[CH_2.(NH_2).CHO]x$, und auch sonst befindet sich das Verhalten der Substanz mit einer solchen Annahme nicht in Widerspruch. Möglicherweise steht sie zum Aminoaldehyd ungefähr in dem Verhältnis von Chitin zum Glucosamin.

Allerdings ist die Rückverwandlung in monomolekularen Aminoaldehyd nicht gelungen. Beim Kochen mit starken Säuren erhielt man zwar stark reduzierende Lösungen, aber bei der großen Empfindlichkeit des Aminoacetaldehyds gegen heiße Mineralsäuren war eine Isolierung des letzteren unmöglich.

Reduktion des Alaninesters.

5,0 g d, l-Alanin wurden nach Vorschrift von E. Fischer[1]) verestert und das hinterbleibende Chlorhydrat des Äthylesters direkt in 10 % iger wässeriger und stets schwach salzsauer gehaltener Lösung mit 100 g Natriumamalgam von 2,6 % behandelt. Die Flüssigkeit nahm starkes Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Mischung an.

p-Nitrophenylosazon.

Mit 5,0 g p-Nitrophenylhydrazin, gelöst in 25 ccm Alkohol und 10 ccm Essigsäure, und 5,0 g Natriumacetat erhält man bei mehrtägigem Erwärmen auf dem Wasserbade 1,27 g p-Nitrophenylosazon des α-Amino-propionaldehyds. Bei einem anderen Versuch wurde die doppelte Menge Amalgam usw. auf 5,0 g verestertes Alanin angewandt und 3,8 g p-Nitrophenylosazon gewonnen.

Dasselbe bildet, aus der Lösung in heißem Pyridin durch Wasser oder besser Toluol gefällt, ein scharlachrotes Krystallpulver, das in den meisten Solvenzien schwer löslich ist. Die Verbindung beginnt bei 255°, sich zu verfärben, und schmilzt gegen 277° unter Zersetzung.

0,1390 g Substanz: 0,2717 CO_2, 0,0556 H_2O;
0,1007 g Substanz: 20,8 ccm N (16°, 769 mm).
$C_{15}H_{14}N_6O_4$.
Ber.: C 52,45, H 4,39, N 24,56 %.
Gef.: C 53,30, H 4,42, N 24,37 %.

Überführung in 2,5-Di-methyl-pyrazin.

Aus der gleichen Menge ebenso behandelten d, l-Alanins wurde in der beim Glykokollaldehyd angegebenen Weise mit Alkali und Sublimat das entsprechende 2,5-Di-methyl-pyrazin

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 34, 433, 1901.

hergestellt. Zunächst wurden 1,2 g Mercurichloriddoppelsalz und daraus 0,52 g Chlorgolddoppelverbindung $C_6H_8N_2.AuCl_3$ (F. 153°) erhalten.

0,1192 g Sbst.: 7,0 ccm N (20°, 745 mm).

0,1016 g Sbst. gaben 0,0493 g Au.

Ber.: N 6,77, Au 47,90%.
Gef.: N 6,56, Au 48,31%.

In einem Versuche mit 10,0 g d,l-Alanin wurden nach Veresterung und Reduktion mit 220 g Natriumamalgam (von 4,6%) von der Di-methyl-pyrazin-Quecksilberverbindung 6,7 g gewonnen. Dieselbe wurde auf ihre Reinheit durch eine Stickstoffbestimmung kontrolliert.

0,4192 g Sbst.: geben 14,0 ccm N (22°, 747 mm) = 3,79%.

Hieraus folgt, daß die Quecksilberverbindung tatsächlich nach der Formel $C_6H_8N_2.2\,HgCl_2$ zusammengesetzt ist, die nach Stöhr[1]) dem Doppelsalze zukommt.

Benzoylverbindung des Alaninaldehyds.

Ähnlich wie beim Aminoacetaldehyd kann man den Alaninaldehyd in eine Benzoylverbindung überführen, doch ist auch hier die Reindarstellung nicht gelungen. Der salzsaure

[1]) Journ. f. prakt. Chem. 47, 455. — Die Verbindung aus Alaninaldehyd ist identisch mit dem Dimethylpyrazin aus dem Isonitrosoaceton oder Aminoaceton [Treadwell und Steiger (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 15, 1060, 1882); Stöhr (l. c.); S. Gabriel u. G. Pinkus (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 2197, 1893)]. Denn die Kondensation muß vom Aminoacetaldehyd und Aminoaceton zu den gleichen Produkten führen:

```
                  H2N                                  N
                     \                               /   \\
       CHO            CH.CH3                       HC      C.CH3
        |      +      |          + O = 3H2O +      ||      |
   CH3.CH            CHO                       CH3.C       CH
         \                                           \    //
          NH2                                          N
```

und

```
          NH2                                          N
         /                                           /   \\
       CH2            CO.CH3                       HC      C.CH3
        |      +      |          + O = 3H2O +      ||      |
   CH3.CO             CH2                      CH3.C       CH
                     /                               \    //
                  H2N                                  N
```

Ester aus 10,0 g d, l-Alanin wurde in der angegebenen Weise reduziert. Die vom Quecksilber abgetrennte Flüssigkeit wurde mit Natronlauge neutralisiert und in einer Stöpselflasche mit 40 g Benzoylchlorid und 20 ccm 30iger Natronlauge abwechselnd unter kräftigem Schütteln behandelt. Die Benzoylverbindung fiel als ein zäher, gelbgefärbter Klumpen aus. Er wurde auf ein Filter gebracht und bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion mit Wasser gewaschen, dann in siedendem Alkohol gelöst und filtriert. Nach dem Verdampfen des Alkohols wurde die zurückbleibende Benzoylverbindung mit 150 ccm 25%iger Salzsäure am Rückflußkühler gekocht, dann von der ausgeschiedenen Benzoesäure abgetrennt, das Filtrat 3mal mit je 50 ccm Äther ausgeschüttelt, mit Knochenkohle entfärbt und im Vakuum bei 40° eingedampft. Das Destillat enthielt merkwürdigerweise eine reduzierende Substanz. Zu deren Isolierung wurde es mit essigsaurem Phenylhydrazin versetzt, und das beim Erwärmen auf dem Wasserbade ausgeschiedene Osazon aus verdünntem Pyridin umkrystallisiert. Es besaß Ähnlichkeit mit dem Methylglyoxalosazon, ist jedoch nicht in ausreichender Menge erhalten worden.

Der Rückstand reduzierte ebenfalls noch stark Fehlingsche Lösung. Er wurde in Wasser gelöst, mit 10 g festem Natriumacetat versetzt und dann mit 2 g p-Nitrophenylhydrazin, das in 15 ccm Alkohol und 10 ccm Essigsäure gelöst war, auf dem Wasserbade erwärmt. Das reichlich ausgeschiedene p-Nitrophenylosazon wurde durch wiederholtes Umfällen aus Pyridin mit Toluol gereinigt; es besaß dann den Schmelzpunkt 276°.

0,0808 g Sbst. ergaben 17,2 ccm N (21°, 756 mm).

$C_{15}H_{14}N_6O_4$. Ber. N = 24,56; gef. N = 24,06%.

Es lag als das p-Nitrophenylosazon des d, l-Alaninaldehyds vor, der aus der Benzoylverbindung regeneriert war.

Reduktion des Leucinesters.

Als Ausgangsmaterial diente Leucin, das durch tryptische Verdauung aus Casein gewonnen war.

Seine Zusammensetzung (Schmelzpunkt im zugeschmolzenen Capillarrohre 268°) wurde durch Analyse des Kupfersalzes kontrolliert:

0,2026 g Sbst.: 0,0495 CuO,
Ber. CuO: 24,44; gef. 24,33%.

Selbstverständlich stellte es ein Gemisch der natürlichen Leucin-isomeren dar.

10,0 g dieses Leucins wurden nach der Vorschrift von E. Fischer[1]) zweimal esterifiziert. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde das Esterchlorhydrat in 100 ccm Wasser gelöst und mit 152 g 4,6%igem Natriumamalgam unter starker Kühlung reduziert; durch gleichzeitiges allmähliches Hinzufügen von 31 ccm rauchender Salzsäure wurde die Reaktion fortwährend sauer gehalten. Die vom Quecksilber abgetrennte Flüssigkeit zeigte merkwürdigerweise kein direktes Reduktionsvermögen. Dasselbe trat jedoch bei längerem Stehen der sauren Reaktionsflüssigkeit bei Zimmertemperatur sowie sofort nach dem Aufkochen ein. Wurde die Flüssigkeit alkalisch gemacht, so schied sich ein Öl aus, das mit Äther ausgezogen werden konnte; nach dem Verdampfen des Lösungsmittels hinterblieb wieder ein öliger Rückstand, der beim Aufkochen mit Mineralsäuren ebenfalls in reduzierende Substanz übergeführt wurde. (Halbacetal?)

Die Oxydation des Leucinaldehyds durch Sublimat und Alkali zu einem Pyrazinderivat, die bei Glykokoll und Alaninaldehyd so glatt verläuft, ist trotz zahlreicher Versuche nicht befriedigend gelungen. Stets entstanden nur Spuren des erwarteten Körpers.

Zum Nachweis des Leucinaldehyds wurde sein

p-Nitrophenylosazon

benutzt.

Das Reduktionsprodukt aus 3,0 g verestertem Leucin wurde bei schwach saurer Reaktion auf dem Drahtnetz 1/4 Stunde im Sieden erhalten, darauf abgekühlt, mit 6 g Natriumacetat und 4 g p-Nitrophenylhydrazin, gelöst in 20 ccm Alkohol und 10 ccm Essigsäure, versetzt. Nach 10stündigem Erwärmen auf dem Wasserbade hatte sich reichlich Osazon abgeschieden, das abgesaugt, mit Wasser und Alkohol gewaschen und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet wurde. Ausbeute 2,42 g. Das sonst in allen Solventien schwer lösliche Produkt wurde wiederholt aus der Lösung in Pyridin durch Petroleumäther ausgefällt. Das so

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 34, 433, 1901.

gereinigte Osazon schmolz bei 256 bis 257° unter Zersetzung. Die Analyse zeigte das Vorliegen von p-Nitrophenylosazon des Leucinaldehyds.

0,1319 g Sbst.: 0,2729 g CO_2, 0,0642 g H_2O.

0,0992 g Sbst.: 18,6 ccm N (14°, 756 mm).

$C_{18}H_{20}N_6O_4$. Ber. C = 56,25; H = 5,21; N = 21,88 %.

Gef. C = 56,42; H = 5,33; N = 21,84 %.

Reduktion des Isoserinesters.

5,0 g Isoserin wurden mit Alkohol und Salzsäure nach der Vorschrift von E. Fischer[1]) esterifiziert; das Esterchlorhydrat wurde nach dem Verjagen des Alkohols in 50 ccm Wasser gelöst, mit 70 g 4,6 % Natriumamalgam, die im Laufe 1 Stunde eingetragen wurden, unter starker Kühlung reduziert; dabei wurde durch allmähliches Hinzufügen von 14 ccm rauchender Salzsäure die Reaktion stets schwach sauer gehalten. Es entstand eine stark reduzierende Flüssigkeit. Dieselbe enthielt wahrscheinlich den von A. Wohl und H. J. Schweizer[2]) beschriebenen Aminomilchsäurealdehyd:

$$CH_2.NH_2 - CH.OH - CHO;$$

allein es gelang nicht, denselben in Form eines der von den Autoren angegebenen Derivate zu charakterisieren.

Auch die sonst bewährte Darstellung des p-Nitrophenylosazons versagte; es entstand zwar reichlich ein p-Nitrophenylhydrazinderivat, dessen Analysen jedoch auf ein Gemisch von Aminomilchsäurealdehyd- mit durch Desamidierung gebildetem Glycerinaldehydderivat hindeuteten.

Es wurde deswegen ein anderer Weg eingeschlagen, der darin bestand, in dem Aminomilchsäurealdehyd durch Behandlung mit salpetriger Säure die Aminogruppe durch Hydroxyl zu ersetzen und so zu dem Glycerinaldehyd zu gelangen. Es zeigte sich, daß bei dieser mit salpetriger Säure ausgeführten Umwandlung der Aminogruppe in den Hydroxylrest teilweise eine Umlagerung eintrat, bei der aus dem Glycerinaldehyd etwas Methylglyoxal entstand. Die Umlagerung ist, wie gesagt, nicht vollkommen, sondern es bildet sich wahrscheinlich

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 3787. 1902.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 40, 92, 1907.

ein Gleichgewichtszustand, zwischen Methylglyoxal und Glycerinaldehyd, da die beiden in Form ihrer Osazone getrennt werden können:

$$\alpha)\ CH_2.NH_2-CH.OH-CHO+HNO_2= CH_2.OH-CH.OH-CHO+H_2O+N_2,$$

$$\beta)\ CH_2.OH-CH.OH-CHO=H_2O+ CH_2=C(OH)-CHO.$$

$$\gamma)\ CH_2=C(OH)-CHO = CH_3-CO-CHO.$$

Der Übergang von Glyerinaldehyd in Methylglyoxal ist bei alkalischer Lösung schon von A. Wohl[1]) festgestellt, ebenso die gleiche Verwandlung des isomeren Dioxyacetons von G. Pinkus.[2])

Sie kann also auch in saurer Lösung stattfinden, wie hier beobachtet ist. Die umlagernde Wirkung der salpetrigen Säure ist übrigens auch bei einem anderen Aminoaldehyd längst bekannt, beim Glucosamin[3]), aus dem an Stelle zu erwartender Glucose bzw. Mannose wahrscheinlich ein wasserärmeres Furanderivat entsteht.

10,0 g Isoserin wurden nach der Esterifizierung wie vorher mit 250 g 2,3°/₀igem Natriumamalgam reduziert. Die Flüssigkeit wurde vom Quecksilber abgegossen, mit 40 ccm 4fach n-Salzsäure und dann tropfenweise unter Kühlung mit einer Lösung von 11,0 g Natriumnitrit in 40 ccm Wasser versetzt und bei 40° 24 Stunden stehen gelassen. Dann ist die Stickstoffentwicklung beendet. Zur Hälfte der Flüssigkeit wurden 40 g Natriumacetat und dann 10 ccm Phenylhydrazin und 20 ccm Essigsäure gefügt. Nach einer halben Stunde schied sich ein voluminöser Niederschlag aus, der aber bei weiterem Stehen selbst im Brutschranke völlig verharzte.

Der zweite Teil wurde deshalb ebenso behandelt, der Niederschlag aber bereits nach $^1/_2$stündigem Stehen im Brutschranke abgesaugt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Es wurde 1,2 g Osazon vom Schmelzpunkt 135° erhalten. Das Osazon wurde aus verdünntem Alkohol um-

---

[1]) Diese Zeitschr. 5, 56, 1907.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 31, 31. 1898.

[3]) E. Fischer und E. Andreae, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 36, 2587, 1903.

krystallisiert, wobei 0,47 g vom Schmelzpunkt 153° gewonnen wurden. Durch nochmaliges Umkrystallisieren erhöhte sich der Schmelzpunkt dieser Fraktion um 2°, auf 155°.

0,1463 g Sbst.: 0,3770 CO_2, 0,0817 g H_2O;

0,0712 g Sbst.: 14 ccm N (21°, 762 mm).

Ber. für $C_{15}H_{16}N_4$: C 71,42, H 6,35, N 22,22%.

Gef.: C 70,21, H 6,20, N 22,33%.

Die aus der Mutterlauge nach zweimaligem Umkrystallisieren gewonnene Substanz besaß den Schmelzpunkt 130°. Die Stickstoffbestimmung hat das Vorliegen von Glycerosazon ergeben.

0.0595 g Sbst.: 10,7 ccm N (19°, 756 mm).

$C_{15}H_{16}N_4O$. Ber. 20,90. Gef.: 20,46%.

Es sei noch bemerkt, daß die reduzierte Lösung des Isoserinesters auf die Fehlingsche Lösung nicht in der Kälte, aber in der Wärme einwirkte. Nach Behandlung mit salpetriger Säure war dagegen schon in der Kälte ein kräftiges Reduktionsvermögen vorhanden, wie es dem Glycerinaldehyd zukommt. Auch die Farbenreaktion des Glycerinaldehyds mit Orcin[1]) stellte sich hiernach ein, während sie vor der Behandlung mit salpetriger Säure negativ ausgefallen war.

[1]) C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 564, 1901.

Über das Verhalten von Aminoacetaldehyd im tierischen Organismus.[1])

Von

T. Kikkoji und C. Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Neuberg[2]) sowie E. Fischer[3]) haben gefunden, daß Aminosäuren durch Reduktion in Aminoaldehyde übergehen:

$$R.CH.NH_2 — COOH \longrightarrow R.CH.NH_2 — CHO.$$

Bei der Leichtigkeit, mit der sich diese Verwandlung vollzieht, ist, wie früher ausgeführt wurde,[2]) die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß im tierischen oder pflanzlichen Organismus ein ähnlicher Übergang stattfinden und bei der großen Reaktionsfähigkeit der Aminoaldehyde zu den verschiedensten Ringsystemen führen kann, die dadurch in eine nahe Beziehung mit den Eiweißstoffen treten würden.

Um die experimentelle Prüfung einer solchen Hypothese anzubahnen, lag es nahe, zunächst das Schicksal des einfachsten Vertreters der Aminoaldehyde, des α-Aminoacetaldehyds

$$NH_2.CH_2.CHO,$$

der aus dem Glykokoll hervorgeht, im Tierkörper zu verfolgen.

Den notwendigen Aminoacetaldehyd stellten wir nicht durch Reduktion von Glykokollester her, sondern einfacher durch Hydrolyse des Aminoacetals, $NH_2.CH_2 — CH(OC_2H_5)_2$, nach den Angaben von E. Fischer[4]) dar. Zu den Versuchen, die an Kaninchen vorgenommen wurden, diente das Chlorhydrat des

---

[1]) Vorgetragen in der Sitzung der Physiol. Ges. vom 12. Febr. 1909.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 956, 1908.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1019, 1908.

[4]) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 92, 1893.

Aminoaldehyds. 2,5 g desselben, gelöst in 25 ccm Wasser, wurden jedesmal unmittelbar vor der Verabfolgung mit festem Natriumbicarbonat angenähert neutralisiert und dann dem etwa 2,5 kg schweren Versuchstiere mit der Schlundsonde beigebracht. Das Kaninchen erhielt täglich 5,0 g in zwei Portionen.

Der 24 Stunden und länger gesammelte Harn zeigte weder Reduktionsvermögen noch optische Aktivität, so daß eine Ausscheidung von unverändertem Aminoacetaldehyd oder ein Übergang desselben in reduzierende und drehende Substanzen nicht nachweisbar war. Da, wie sich später herausstellte, die Menge faßbarer Umwandlungsprodukte nur gering war, wurde der Harn desselben Tieres gesammelt, bis ihm 30 g Aminoaldehyd beigebracht waren, und mit Chloroform konserviert. Einige, aber durchaus nicht alle Portionen wiesen einen unverkennbaren, gewissen Basen eigenen Geruch auf, der uns veranlaßte, den Harn auf flüchtige Produkte zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurden die vereinigten Harnportionen (etwa 4 l) mit starker Natronlauge deutlich alkalisch gemacht und aus einem Rundkolben mit Wasserdampf destilliert. Das alkalisch reagierende Destillat, von dem ungefähr 750 ccm aufgefangen wurden, wurde mit Salzsäure neutralisiert und mit gesättigter Sublimatlösung ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wurde nach 24 Stunden abfiltriert, mit kaltem Wasser ausgewaschen und in einem Rundkolben nach Zusatz von Natronlauge wieder der Destillation mit Wasserdampf unterworfen. Auf Zusatz von starker Goldchloridlösung zu dem filtrierten Destillate fiel sofort ein gelber Niederschlag aus, der nach 24 Stunden abgesaugt und aus viel heißem Wasser umkrystallisiert wurde. Die Menge der im Vakuumexsiccator getrockneten Substanz betrug 0,951 g; sie bestand aus feinen Nadeln, die bei 202° schmolzen[1]) und eine gelbe Farbe mit einem Stich ins Grünliche besaßen.

0,2150 g Substanz: 13,1 ccm N (bei 18°, 780 mm);

0,1411 g Substanz: 0,0635 g CO_2, 0,0164 g H_2O;

0,1031 g Substanz ergaben bei gleichzeitiger Analyse von

---

[1]) Der Schmelzpunkt von Pyrazingoldchlorid, als das sich das Salz erwies, liegt nach L. Wolff (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 1832, 1893) bei 200°, nach Stöhr (Journ. f. prakt. Chem. 48, 21) bei 202° bis 203°.

Gold und Chlor nach O. Wallach[1]) 0,0530 g Gold und verbrauchten 7,8 ccm $^{n}/_{10}$-$AgNO_3$-Lösung.

0,1105 g Substanz gaben nach dem Glühen 0,0569 g Gold.

Gefunden:	Berechnet für $C_4H_4N_2 . AuCl_3$:
C = 12,27 %	C = 12,51 %
H = 1,29 %	H = 1,04 %
N = 7,18 %	N = 7,30 %
Au = 51,45 % und 51,49 %	Au = 51,37 %
Cl = 27,69 %	Cl = 27,72 %

Verhalten, Zusammensetzung und Schmelzpunkt, namentlich die eigentümliche Formel der Aurichloriddoppelverbindung, die beim Umkrystallisieren aus heißem Wasser aus dem normalen goldchlorwasserstoffsauren Salz ($C_4H_4N_2 . HAuCl_4$) unter Verlust von Salzsäure entsteht, sind für die entsprechende Pyrazinverbindung[2]) durchaus charakteristisch.

Der Aminoacetaldehyd geht demnach im tierischen Organismus, ähnlich wie auf chemischem Wege,[3]) leicht durch Oxydation in Pyrazin über:

$$\begin{matrix} NH_2 \\ CH_2 \\ | \\ CHO \end{matrix} + \begin{matrix} CHO \\ | \\ CH_2 \\ NH_2 \end{matrix} + O = 3H_2O + \begin{matrix} & N & \\ CH & & CH \\ \| & & | \\ CH & & CH \\ & N & \end{matrix}$$

Allerdings scheint nur ein kleiner Teil dieser Umwandlung zu unterliegen, die Hauptmenge wird in anderer, bisher nicht ermittelter Weise umgesetzt bzw. verbrannt.

Im Gegensatz zum Glykolaldehyd[4]) ($CH_2 . OH — CHO$), zu dem der Aminoacetaldehyd ($CH_2 . NH_2 — CHO$) im Verhältnis von Glucosamin zu Traubenzucker steht, ist beim Aminoaldehyd keine Kondensation zu Aminozuckern oder stickstoffreien Kohlenhydraten im Organismus nachweisbar gewesen, auch Reversions-

---

1) O. Wallach, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 14, 753, 1881.

2) Stöhr sowie Wolff l. c.

3) L. Wolff, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 1830, 1893 — S. Gabriel u. G. Pinkus, ebenda 26, 2207, 1893. — C. Neuberg, ebenda 41, 961, 1908.

4) Dieser geht nach Paul Mayer (Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 135, 1903) z. T. in Glucose über.

produkte[1]) entstanden nicht, da der an sich nicht reduzierende Harn auch nach dem Kochen mit Säuren nicht reduzierte.

In gewisser Hinsicht ist das Verhalten des Aminoacetaldehyds im Organismus des Kaninchens dem des Glucosamins ähnlich, das nach den Untersuchungen von K. Spiro[2]) und K. Stolte[3]) in manchen Fällen zur Bildung von Pyrazinderivaten, von 2,5-Di-tetra-oxybutyl-pyrazin, 2-Oxymethyl-pyrazin-5-carbonsäure und 2,5-Pyrazin-di-carbonsäure, im Tierkörper Anlaß gibt.

Auch pflanzenphysiologisch ist die Bildung von Pyrazinderivaten von Interesse. So ist das Auftreten von Pyrazin und 2,5-Dimethylpyrazin bei der Hefengärung[4]) nachgewiesen; hier begleiten diese Stoffe allem Anscheine nach konstant, aber in wechselnder Menge das Fuselöl.[5]) Es liegt demnach nahe, wie für die alkoholischen Bestandteile (F. Ehrlich[6]) desselben auch für die basischen eine Herkunft aus Aminosäuren und damit aus dem umgesetzten Hefeneiweiß anzunehmen. Das Pyrazin selbst kann, wie gezeigt, aus dem Glykokoll, das 2,5-Di-methyl-pyrazin aus dem Alanin entstehen; denn letzteres geht leicht in Alaninaldehyd und dieser in 2,5-Di-methyl-pyrazin[7]) über. [Mono-methyl-pyrazin, das vielleicht auch bei der Hefengärung vorkommt, könnte durch Zusammentritt je eines Mol. Glykokollaldehyd und Alaninaldehyd:

$$\begin{array}{l} CHO \\ | \\ CH_2 \\ \quad \diagdown \\ \quad NH_2 \end{array} + \begin{array}{l} H_2N \\ \quad \diagdown \\ \quad CH.CH_3 \\ \quad | \\ \quad CHO \end{array} + O = 3\,H_2O + \begin{array}{c} \diagup N \diagdown \\ \begin{array}{c|c} CH & C.CH_3 \\ \| & \| \\ CH & CH \end{array} \\ \diagdown N \diagup \end{array}$$

gebildet werden.]

---

1) C. Neuberg und E. Kansky, diese Zeitschr. 20, 454, 1909.

2) K. Spiro, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 277, 1907.

3) K. Stolte, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 19, 1908; ferner diese Zeitschr. 12, 499, 1908.

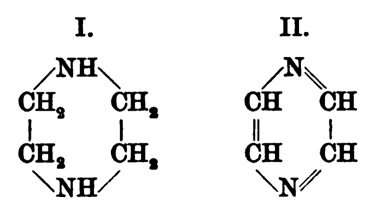
4) C. Stoehr, Journ. f. prakt. Chem. 54, 481, 1897.

5) E. Bamberger u. A. Einhorn, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 30, 224, 1907.

6) F. Ehrlich, diese Zeitschr. 2, 52, 1906.

7) C. Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 962, 1908 und C. Neuberg und E. Kansky, diese Zeitschr. 20, 456, 1909.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß ein Bestandteil des tierischen Organismus, dessen Entstehung noch gänzlich unbekannt ist, das Spermin (I), $C_4H_{10}N_2$, nach der jetzt vielfach angegebenen Formulierung eine nahe Beziehung zum Pyrazin (II), $C_4H_4N_2$, aufweist:



Tatsächlich geht Pyrazin durch Reduktion[1]) leicht in Piperazin (= Spermin [?]) und dieses durch Oxydation[2]) in Pyrazin über. Auch für die Base der Charcotschen Krystalle und für manche Ptomaine ist die Möglichkeit eines Zusammenhanges mit den Pyrazinen in Betracht zu ziehen.

---

[1]) W. Marckwald u. A. Ellinger, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 98, 1893. sowie L. Wolff. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 721, 1893.

[2]) Stöhr, Journ. f. prakt. Chem. [2] 47, 451.





Die Hautfette.

Von

P. G. Unna und L. Golodetz.

(Eingegangen am 30. Juni 1909.)

I. Historisch-Kritisches.

Die klassische Lehre vom Fett der Hautoberfläche, die wir den vorzüglichen Untersuchungen von Krause sen. (1844), Meißner, Henle und Kölliker verdanken, kennt nur zwei verschiedene Quellen desselben: die Talgdrüsen und Knäueldrüsen. Diese Lehre herrschte bis 1875, als Ranvier in den basalen Hornzellen das Eleidin[1]) beschrieb als: „une substance, qui a la consistance et la réfringence d'une huile essentielle". Mit diesem Funde war zum ersten Male den Oberhautzellen selbst die Fähigkeit zugesprochen, aus sich heraus eine wohl charakterisierte, fettige Substanz zu bilden. Wir hätten also seit dieser Zeit drei verschiedene Quellen des Hautfettes zu unterscheiden, wenn diese dritte Fettquelle ebenso sicher mikrochemisch nachgewiesen wäre wie die beiden erstgenannten. Dieses ist nun aber nicht der Fall.

Der Aufnahme der Ranvierschen Entdeckung in Deutschland stand in den ersten Jahren entgegen, daß Ranvier, lediglich gestützt auf die Tinktion mit pikrocarminsaurem Ammoniak, sein Eleidin mit dem davon ganz verschiedenen Keratohyalin Waldeyers identifizierte. Erst Buzzi[2]) zeigte in einer überaus sorgfältigen Untersuchung, daß das Keratohyalin der Körnerschicht und das Eleidin der basalen Hornschicht zwei histologisch, tinktoriell und histochemisch durchaus verschiedene Substanzen sind und daß nur das Eleidin der basalen Hornschicht einem Glycerinfett ähnlich, wenn auch sicher nicht einfach ein Glycerinfett ist, da es auch an mit Äther und Chloroform behandelten Schnitten sich darstellen läßt. Die weiteren Arbeiten über das Eleidin von Grosse, Dreysel und Oppler, Buzzi und Frickenhaus brachten wertvolle Mitteilungen über die Darstellung und Verbreitung dieser Substanz, jedoch

[1]) Vgl. besonders: Ranvier, De l'éléidine et de la répartition de cette substance dans la peau, la muqueuse buccale et oesophagienne des vertébrés. Arch. de Physiol. 1884.

[2]) Buzzi, Keratohyalin und Eleidin. Monatsh. f. prakt. Derm. 8, 1 u. 149, 1889.

keine Klärung über das Wesen derselben. Wir waren daher bis vor kurzem genau so im unklaren darüber, ob das Eleidin zum Teil fettiger Natur ist, wie zur Zeit seiner Entdeckung. Im vorigen Jahre aber konnte Ciliano[1]) mit Sicherheit nachweisen, daß das Ranviersche Eleidin weder selbst ein Fett ist noch einen fettigen Bestandteil enthält, sondern einen albuminartigen, genuinen Eiweißkörper darstellt.

Vor 23 Jahren wurde aber, auf die Ranviersche Hypothese gestützt, mit einem Schein von Berechtigung der Versuch gemacht, eine Theorie des Oberhautfettes auf das Eleidin zu stützen.

Liebreich nämlich, der die im Wollfette und in dem aus Wollfett dargestellten Lanolin befindlichen „Cholesterinfette" in allen tierischen Hornsubstanzen und so auch in der menschlichen Hornschicht durch Liebermanns Cholestolreaktion nachweisen zu können glaubte (1885), sprach die Vermutung aus, daß speziell Ranviers Eleidin „ein Gemenge von Eiweiß und Cholesterinfett" oder — wie es an anderer Stelle heißt — daß „das Eleidin eine chemische Vorstufe des Lanolins" sei.

Diese Vermutung von Liebreich wurde sofort von Lewin und Sticker aufgegriffen (1886), welche, ohne zu wissen, daß das feste Keratohyalin der Körnerschicht und das flüssige Eleidin der basalen Hornschicht ganz verschiedene Körper sind, sowohl in der Körnerschicht wie in der Hornschicht, Cholesterinfette mittels der Cholestolreaktion nachzuweisen sich bemühten. Die völlige Unhaltbarkeit dieser Angaben von Lewin und Sticker wurde von Buzzi überzeugend dargetan. Er und nach ihm Santi zeigten, daß mittels der Cholestolreaktion überhaupt nur Cholesterin, nicht Cholesterinester, in der menschlichen Haut nachgewiesen sei und daß an eine Identifizierung von Ranviers Eleidin mit Cholesterinfetten nicht gedacht werden könne.

Wohl selten ist in der Medizin und physiologischen Chemie eine anatomisch und chemisch gleich schlecht begründete These über 20 Jahre lang so zur Herrschaft gelangt wie die Behauptung von Liebreich, daß die menschliche Hornschicht Lanolin enthielte. Dieses falsche Dogma hat unsere physiologischen Kenntnisse der Hautsekretion fast um ein Vierteljahrhundert zurückgehalten. Ohne daß die kritischen Arbeiten von Buzzi und Santi eingehend erörtert und entkräftet wurden, eroberte sich die, wie es scheint, mit faszinierender Anziehungskraft begabte Lehre von Liebreich sukzessive die Physiologie, Pathologie, ja die Pharmakologie der Haut. Angesehene und sonst sehr kritische Forscher nahmen sie auf, ohne ihre Grundlagen weiter zu prüfen, bloß auf Liebreichs Autorität hin, und stützten sie dann weiterhin durch ihre eigene Autorität.

In erster Linie ist hier Filehne[2]) zu nennen. Indem er den Lanolingehalt der menschlichen Oberhaut als eine bereits bewiesene Tatsache hinnahm, suchte er das alte Problem der Resorptionsfähigkeit der

[1]) Ciliano, Eleidin. Monatsh. f. prakt. Derm. 46, 435, 1908.

[2]) Filehne, Über die Durchgängigkeit der menschlichen Epidermis für feste und flüssige Stoffe. Berl. klin. Wochenschr. 1898, 45.

menschlichen Haut von dem unter dieser Voraussetzung allerdings gerechtfertigten Standpunkt aus neu zu beleuchten, ob unsere Medikamente in Lanolin löslich seien oder nicht. Nach Filehne ist unsere Oberhaut eine mit Cholesterinfetten durchtränkte und an ihrer äußeren Fläche mit Fett, Hauttalg, überzogene Diffusionsmembran. Er sagt: „Bei der Mischbarkeit von Cholesterinfetten (Lanolin) und eigentlichen Fetten (Hauttalg) hat also eine Substanz, die von außen durch die Epidermis bis zum resorbierenden Corium hindurchdringen soll, zwischen Hauttalg und den tieferen, nur Cholesterinfett führenden Epidermiszellen die oberflächlichste Epidermiszellenschicht zu passieren, welche in den Cholesterinfetten (Lanolin) Hauttalg ‚gelöst' enthält."

Auf Grund der Unlöslichkeit von Kochsalz, Jodkalium, Ferrum carbonicum, Arsenik, Tartarus stibiatus und Quecksilber in Lanolin, erklärt dann Filehne konsequenterweise die Resorption aller dieser Stoffe durch die Oberhaut hindurch für unmöglich. Es wird ihm dieses Bekenntnis als Arzt und Pharmakologen, besonders in Ansehung der letztgenannten Medikamente, nicht leicht, und er kommt naturgemäß zu dem weiteren Schlusse:

„Wenn also die soeben angeführten Stoffe irgend eine pharmakodynamische Wirkung auf die Haut entfalten — was doch für Tartarus stibiatus (in Gestalt der Pockensalbe), für graue Salbe (das sog. ‚Eczema mercuriale') usw. nicht geleugnet werden kann — so geht ihr Weg hierbei nicht durch die Epidermis."[1])

Filehne ist so vollständig überzeugt von der Anwesenheit des Lanolins in jeder menschlichen Hornschicht, daß er allen Ernstes die Frage ventiliert, ob sich aus dem Lanolinum anhydricum der Hornschicht im Verlaufe eines gewöhnlichen Bades innerhalb der Hornschicht Lanolinum hydricum (d. i. das Lanolin des Handels) bilden könne. Er verneint diese Frage auf Grund der Erfahrung, daß Lanolin Wasser nur durch Einkneten aufnimmt.

Während Filehne die pharmakologische Wirkung des Lanolins der menschlichen Oberhaut zu erforschen suchte und zu einer festen, auf diese Wirkung gegründeten Theorie fortschritt, stützte Gottstein durch eine bemerkenswerte Arbeit: über das Verhalten der Mikroorganismen gegen Lanolin[2]) das Gebäude der Liebreichschen These von der biologischen Seite. Er fand, daß Lanolin im Gegensatz zu den Glycerinfetten kein Nährboden für Bakterien sei und schloß unter der Annahme, daß die menschliche Oberhaut mit Cholesterinfett imprägniert sei, ganz folgerichtig, daß das unsere normale Oberhaut imprägnierende Fett für Mikroorganismen unzersetzlich und folglich eine Schutzdecke gegen deren Eindringen in den menschlichen Körper sei.

---

[1]) Man sieht hier schon die jetzt herrschende einseitige Lehre aufleuchten, daß die Resorption des Quecksilbers bei der Schmierkur hauptsächlich durch Einatmung verdunstenden Quecksilbers zustande käme.

[2]) Berl. klin. Wochenschr. 1887, 907.

Mir liegt nichts ferner, als den Wert dieser ernsten, gehaltvollen und mühevollen Arbeiten an sich irgendendwie herabzusetzen. Beide Arbeiten werden — besonders in pharmazeutischer Richtung — bleibenden Wert behalten. Was ich nur auf das entschiedenste bekämpfen muß, das sind die Schlußfolgerungen, die aus ihnen von den Autoren und den meisten Lesern für die Pharmakologie und Biologie der menschlichen Haut unter der Voraussetzung gezogen worden sind, die menschliche Haut enthielte Lanolin. Gerade die Unbefangenheit, mit der aus Versuchen mit Lanolin im Reagierglase von ernsten Forschern auf anatomische und physiologische Verhältnisse der Haut geschlossen wurde, war es hauptsächlich, welche die Ärztewelt von der Wahrheit der Liebreichschen These überzeugte und dieser ein so langes Dasein verschaffte. Diesem Einflusse konnten selbst die Anatomen und Physiologen von Fach auf die Dauer nicht widerstehen; ebenso wenig die Dermatologen, obwohl besonders letztere gewiß nicht ungewarnt waren. Um den Leser nicht zu ermüden, will ich die vielerlei Andeutungen in der Literatur, welche die Verbreitung der Liebreichschen These in allen diesen Gebieten beweisen, übergehen und nur auf die Bemerkungen einiger Autoren noch hinweisen, welche jene These ebenso folgerichtig verwerten wie Filehne und Gottstein.

Die neue, durch ihre Gründlichkeit ausgezeichnete Physiologie der Haut von Kreidl[1]) steht ganz unter dem Banne der Liebreichschen These. Kreidl macht sich als Physiologe einfach die Anschauung des Pharmakologen Filehne zu eigen, wonach die Oberhaut von Cholesterinfetten durchtränkt und mit Talg überzogen ist.

Auch die allerneueste Physiologie des Hauttalges von R. Metzner in Nagels Handbuch der Physiologie des Menschen (1907) reproduziert diese Anschauung und stützt sich dabei sogar auf die bereits (1889) von Buzzi widerlegte Angabe von Lewin, daß mittels der Cholestolreaktion in der Körnerschicht Cholesterin nachzuweisen sei (2, 396, Anm.).

Joseph sagt in der vierten Auflage seines weitverbreiteten Lehrbuchs der Hautkrankheiten (S. 21):

„Ich glaube, daß für die menschliche Haut beide Momente, die Sekretion des Fettes aus den Talgdrüsen und die Umwandlung von Cholesterinfetten aus Keratinsubstanzen in Betracht kommen.“

Und weiter:

„Die Cholesterinfette als normaler Bestandteil der menschlichen Epidermis bilden auch eine Schutzdecke gegen die äußere Infektion.“

Eine neue Theorie stellt Joseph sodann über das Fett des Hohlhandschweißes auf, wobei es entschieden anzuerkennen ist, daß er dieses von Liebreich und neueren Autoren der Breslauer Schule überhaupt nicht mehr anerkannte Hautfett wenigstens tatsächlich bestehen läßt. Er sagt:

„Es ist wohl möglich, daß dieses aus den Epidermiszellen gebildete Cholesterinfett sich teilweise dem Schweiße beigesellt. Hierdurch würde

[1]) In Mraček's Handb. d. Hautkrankh. 1901, S. 174.

auch die Tatsache, daß in der Hohlhand sezernierter Schweiß, trotzdem hier keine Talgdrüsen existieren, deutlich fetthaltig ist, ihre genügende Erklärung finden."

Aus diesen Zitaten geht deutlich das Bestreben jüngerer Dermatologen und Physiologen hervor, an Stelle der zwei klassischen Fettquellen, der Talgdrüsen und Knäueldrüsen, ein anderes Paar Fettquellen zu setzen: die Talgdrüsen und das Cholesterinfett der Oberhaut. Auch diese Anschauung geht auf Liebreichs erste Arbeiten zurück, welcher unter prinzipieller Verneinung[1]) der Fettabsonderung der Knäueldrüsen das Cholesterinfett der Oberhaut zum wesentlichen Fettprodukt der Haut machen und dem Talgdrüsenfett nur die merkwürdige Rolle eines Adjuvans und Corrigens dieses Oberhautfettes zugestehen wollte. Er trennte für die Einfettung der Haare scharf das wesentliche, intracellulare Cholesterinfett der Haare selbst von dem nur „additionellen" der Talgdrüsen und glaubte an der Pfauentaube und dem Faultier nachgewiesen zu haben, daß die nötige Einfettung der Haare auch ganz ohne Talgdrüsenfett, nur durch intracelluläres Cholesterinfett bewirkt werden könnte.

Ihren markantesten Ausdruck fand diese Auffassung in der schon genannten Dissertation von Sticker (Über die Entwicklung und den Bau des Wollhaares beim Schafe. Berlin 1887). Dieser Autor sagt kurz und bündig:

[1]) In seinem Vortrage: Über die biologische Bedeutung der Vernix caseosa (Verhdl. d. Deutsch. derm. Ges., 4. Kongr., 1894, 42) sagt Liebreich: „Die Schweißdrüsen produzieren natürlich kein Fett; Herr Unna stellt die paradoxe Behauptung auf, daß auch die Schweißdrüsen Fett produzieren. — Man sollte meinen, daß es nicht nötig wäre, derartige Äußerungen zu widerlegen. Es scheint aber, daß manche auf der Hand liegenden Unrichtigkeiten der Unnaschen Behauptungen für Ernst genommen wurden, und so ist es denn ganz verdienstlich, daß Herr Wallace Beatty (Brit. Journ. of Dermatol., April 1893; Ref. Therap. Monatsh. 1893, 246) Unnas Ansicht durch eine Reihe von Experimenten kassiert hat." — Dieser Triumph Liebreichs dauerte nicht lange. Schon im August desselben Jahres (1894) demonstrierte ich in der Sektion für Dermatologie der Jahresversammlung der British medical Association in Bristol den Fachkollegen das osmierte Fett der Knäueldrüsen an einer großen Reihe von Präparaten und zeigte, daß die abweichenden Resultate von Wallace Beatty die Folge mangelnder Beherrschung der Osmiummethode waren. In England ist seitdem kein Widerspruch gegen die Fettabsonderung der Knäueldrüsen mehr aufgetaucht. Die Beweise für den Fettgehalt und die Fettabsonderung der Knäueldrüsen finden sich in: „Die Funktion der Knäueldrüsen des Menschen." Deutsche Med.-Zeitg. 1894, Nr. 1 u. 2. „Die Fettfunktion der Knäueldrüsen." Ebenda 1898, Nr. 43. „Der Nachweis des Fettes in der Haut durch sekundäre Osmierung." Monatsh. f. prakt. Dermatol. 26, 601, 1898.

„Eleidin ist ein Gemenge von Eiweiß und Cholesterinfett. Dieses Eleidin ist das eigentlich geschmeidig erhaltende Fett der Haut und der Haare. Das Talgdrüsenfett ist nur additionell und spielt nur die Rolle eines Neutralisators des unter Umständen überreichlich gebildeten Eleidins."

Diese absonderliche Idee kann nicht besser kritisiert werden als mit den Worten Buzzis:

„Endlich ist mir durchaus nicht verständlich, was es heißen soll, daß das Talgdrüsenfett nur ‚additionell' ist und ein überreichliches (sic!) Eleidin neutralisieren (!) soll. Weshalb soll das Eleidinfett (im Sinne Liebreichs und Stickers) normalerweise überreichlich produziert werden? Kann man sich vorstellen, daß eine so konstante Bildung wie die Talgdrüsen an den Haaren nur eine Art Hemmungseinrichtung für das Übermaß einer anderen Bildung sei? Was heißt es denn, daß ein Fett ‚neutralisiert' wird, und dazu noch durch ein anderes Fett? Mich dünkt, zwei Fette zusammen sind noch fetter als eines allein. Hier hat Sticker entschieden ein großes Wort gelassen ausgesprochen."

Die berechtigte Kritik von Buzzi und Santi hat allerdings zur Folge gehabt, daß späterhin nicht mehr das Ranviersche Eleidin zur Stütze der Hypothese des Cholesterinfettes in der Hornschicht herangezogen wurde, der Kern der Liebreichschen Anschauung aber, daß 1. nur zwei Fette für die menschliche Haut in Betracht kommen: intracelluläres Cholesterinfett und Talgdrüsenfett, daß 2. nach Herkunft (dort Oberhautzellen, hier Talgdrüsenzellen) und chemischer Natur (dort Cholesterinfett, hier Glycerinfett) eine Art Antagonismus zwischen diesen zwei Fettquellen existiert und daß 3. die Knäueldrüsen als Fettquelle für die Haut prinzipiell zu vernachlässigen sind — diese drei wesentlichen Bestandteile der Liebreichschen Anschauung werden neuerdings wieder von jüngeren Dermatologen aus der Breslauer Schule aufgenommen und verteidigt.

In erster Linie ist hier die fleißige Arbeit von Linser[1]) zu nennen, die ein bedeutendes Tatsachenmaterial zusammenträgt. Auch Linser glaubt, die Knäueldrüsen als Fettquelle vernachlässigen zu können. Auch für ihn besteht das Hautfett als Ganzes aus den zwei Bestandteilen: Talgdrüsenfett und Cholesterinfett der Oberhautzellen. Aber hier findet sich schon eine erhebliche Abweichung von Liebreich, indem Linser sagt:

„Das Sekret der Talgdrüsen . . . ist . . . der quantitativ weit überwiegende Teil des Hauttalges, mit dem man jedenfalls am meisten zu rechnen hat."

Und weiter:

„Der Hauttalg in seiner Gesamtheit ist aber nicht als Cholesterinfett zu betrachten, sondern besteht wahrscheinlich nur zum kleinsten Teil aus solchem."

---

[1]) Linser, Über den Hauttalg beim Gesunden und bei einigen Hauterkrankungen. Tübinger Habilitationsschrift, 1904.

Für Linser ist also, um einmal Liebreichs Ausdruck zu gebrauchen, gerade umgekehrt das Cholesterinfett der Hornschicht das „additionelle" Fett und das Fett der Talgdrüsen der Hauptbestandteil, das Wesentliche des Hauttalges.

Auch in einem zweiten, sehr wichtigen Punkte besteht zwischen Linser und Liebreich keine Übereinstimmung, wenigstens, wenn nicht die Worte, sondern die Tatsachen gewogen werden. Nachdem Liebreich schon von Buzzi und Santi entgegengehalten worden war, daß er in den Hornsubstanzen mittels der Cholestolreaktion gar kein Cholesterinfett, sondern nur Cholesterin nachgewiesen hätte, dessen Vorkommen daselbst schon lange, besonders durch Hoppe-Seyler erkannt war, mußte das Hauptaugenmerk einer jeden Untersuchung des Hautfettes gerade auf das Vorkommen und die Isolierung von Cholesterinestern (sog. Cholesterinfetten) gerichtet sein. Linser hätte als Anhänger von Liebreichs Anschauung gerade diese Lücke in den Liebreichschen Arbeiten ausfüllen müssen. Linser findet nun wohl überall im Hautfett mehr oder weniger Cholesterin, nirgends ist aber von einer Trennung des Cholesterins von Cholesterinfetten die Rede, die Liebreich, wenigstens in seinen späteren Lanolinarbeiten, versucht hatte. Linser hat nach den Vorschriften von Benedict-Ulzers Lehrbuch[1]) — die genauere Methode wird nicht angegeben — die Hautfette verseift und im Unverseifbaren bei einigen Substanzen (Horn, Huf, Atherom) im Ätherauszuge viel, bei anderen (Hauttalg, Cerumen, Smegma, Dermoid) wenig Cholesterin gefunden. Er vermutet, ebenso wie Liebreich, daß dasselbe zum Teil esterartig in jenen Substanzen gebunden war und spricht daher in seinem Resümee auch von „Cholesterin und seinen Estern". Der einzige Beweis aber für das esterartige Vorkommen des Cholesterins, d. h. für das Vorkommen von „Cholesterinfetten" im Sinne Liebreichs, steht auf etwas schwachen Füßen.

Linser findet nämlich, daß alle Talgdrüsensekrete sich durch niederen Schmelzpunkt, niedere Säurezahlen und niedere Verseifungszahlen auszeichnen, welch letztere ausnahmslos unter denen von Glycerinfetten stehen. Aus diesen niederen Verseifungszahlen schließt Linser, „daß der Hauttalg, wenn überhaupt Glycerinfette darin sind, neben diesen noch die Ester hochmolekularer Alkohole, z. B. des Cholesterins und anderer unverseifbarer Substanzen enthält." Nun wird in der Tabelle S. 16 die Menge des Unverseifbaren im Ätherextrakt des Hauttalges zu 40 bis 45% angegeben. Gesetzt den Fall, daß alles Unverseifbare frei vorhanden war[2]) und das übrige (55 bis 60%) aus Glycerinfetten bestand, welchen eine Verseifungszahl von durchschnittlich 200 zukommt, so würde allein durch diese große Menge des daneben

[1]) Benedict, Analyse der Fette und Wachsarten. 4. Aufl., bearbeitet von Ulzer. Julius Springer, Berlin.

[2]) Gesetzt den anderen Fall, daß ein Teil des 40 bis 45% betragenden Unverseifbaren ursprünglich als Ester gebunden war, so sinkt die Verseifungszahl noch tiefer als hier angegeben wird.

vorhandenen freien Unverseifbaren die Verseifungszahl des Gemisches schon fast auf die Hälfte herabgedrückt. nämlich auf 110 bis 120. Die außerdem nach Linser im Gemisch vorhandenen freien Fettsäuren erhöhen diese Zahl allerdings, aber die Menge derselben muß entsprechend der niederen Säurezahl Linsers nur gering sein. Linser gibt nun die Verseifungszahl das Hauttalges in derselben Tabelle = 117 bis 140 an. Wir kämen also ziemlich genau, aber unter der diametral entgegengesetzten Voraussetzung zu ähnlichen Verseifungszahlen.

Man sieht hieraus, daß die Verseifungszahlen von Linser sich ebensogut mit der Annahme von Glycerinfetten neben viel freiem Cholesterin wie durch die Linsersche Annahme von Cholesterinfetten im Hauttalge erklären lassen. Jedenfalls kennzeichnet diese bescheidene und hypothetische Einführung der Cholesterinfette, eventuell neben Glycerinfetten, in den Hauttalg durch Linser schon einen ganz anderen Standpunkt als den vorher charakterisierten von Liebreich.

Noch in einem dritten Punkte geht Linser selbständig über Liebreich hinaus, nämlich in der Aufstellung eines besonderen und besonders wichtigen Bestandteiles der meisten Hautfette, seines „Acetonkörpers". Er fand im Unverseifbaren des Hauttalges, des Cerumens, der Dermoide und Menschenhaare einen krystallinischen Körpers, der in kaltem Alkohol, Petroläther, Benzol, Toluol, Amylalkohol, Äther und Chloroform leicht löslich war, schwer löslich in kaltem Essigäther und besonders Aceton, während er sich in der Wärme in diesen Lösungsmitteln leicht löste.

Nähere Angaben über diesen Körper werden nur bei der Gewinnung aus Dermoiden gemacht. Linser sagt:

„Durch mehrfaches Umkrystallisieren gelang es, einen weißen, homogenen, in Nadeln krystallisierten Körper von dem konstanten Schmelzpunkt 64° bis 65° rein zu gewinnen. Derselbe gab keine Cholestolreaktion, ließ sich nicht acetylieren und besaß eine Jodzahl von 26,5 ... Die Menge dieses ‚Acetonkörpers' betrug ca. $^1/_3$ der nicht verseifbaren Substanzen. Die Elementaranalyse ergab 79,32 bis 79,5 % C und 13,69 bis 14,08 % H. Also im Durchschnitt 79,4 % C und 13,9 % H. Derselbe ist nicht acetylierbar und daher nicht als ein Alkohol anzusehen ... Nach der Isolierung des Acetonkörpers hinterblieb ein auch in der Kältemischung nicht erstarrendes Öl mit hohem Bromadditionsvermögen und einer Jodzahl von 106,5. Elementaranalyse: 12,31 % H und 80,56 % C. ... Die Acetylierung gelang auch bei dieser Substanz nicht."

Über die chemische Konstitution seines „Acetonkörpers" und des „öligen Rückstandes" ist Linser nicht ins klare gekommen; an einer Stelle charakterisiert er sie als „hochmolekulare C- und H-reiche Substanzen".

Im Gegensatz zu diesen selbständigen Fortschritten Linsers steht derselbe in einem vierten Punkte, der uns nun der wesentlichste zu sein scheint, ganz im Banne der Liebreichschen Anschauung. Er vernachlässigt grundsätzlich das so überaus wichtige Fett des Schweißes; und es ist nach seinen eigenen Bestimmungen über diesen Teil des Hautfettes eigentlich gar nicht ersichtlich, weshalb er ihn vernachlässigt.

Sein erster Grund für die „Belanglosigkeit der Schweißdrüsen für die Sekretion des Hauttalges" ist die äußerst geringe Menge von aus dem Schweiß durch Äther extrahierbaren Substanzen. „Aus 15 l Schweiß, die in der Hautklinik zu Breslau von einer Reihe von Kranken mittels Heißluftbädern im Gummisack aufgefangen wurden, ließ sich nur 1,8 g ätherextrahierbarer Substanzen, also nur etwa 0,01% gewinnen."[1]) Betrachtet man dieses Prozentverhältnis, so erscheint ja in der Tat die Fettlieferung der Schweißdrüsen als eine minimale. Vergleichen wir aber damit die Ausbeute, welche Linser an einem mittelgroßen, mageren Erwachsenen in einem Zeitraum von 3 Wochen durch tägliche Abreibung des gesamten Rumpfes mittels eines in Petroläther getauchten entfetteten Gazebausches erhielt, so war diese ebenfalls nur 1,5 g Ätherextrakt. Der Anschein einer minimalen Fettleistung wird nur dadurch gewonnen, daß Linser zu dem von ihm doch tatsächlich erhaltenen fettigen Schweiß die 15 l wässerigen, durch künstliche Schwitzprozeduren erzeugten Schweißes hinzuaddiert. Ich habe in meinen verschiedenen Arbeiten über das Fett der Knäueldrüsen, so wenig wie irgend ein anderer, behauptet, daß der gesamte Schweiß beim künstlichen Schwitzen zum großen Teil aus Fett bestände, sondern immer nur, daß das Fett der ruhenden Knäueldrüsen beim forzierten Schwitzen ausgewaschen wird, was sich an der dabei immer abnehmenden Säurereaktion des Schweißes deutlich zu erkennen gibt. Es wäre sehr unphysiologisch, zu verlangen, daß parallel den unter Nerveneinfluß in kurzer Zeit von den Knäueldrüsen abgegebenen profusen Wassermengen eine gleich starke Steigerung der Fettsekretion in denselben stattfinden sollte.

Tatsächlich hat also Linser bei den akut Schwitzenden eine gar nicht unerhebliche und jedenfalls nicht zu vernachlässigende Menge Hautfett gefunden (1,8 g), während ihm die geringe Ausbeute bei den wochenlang entfetteten, nicht schwitzenden Personen selbst auffiel (1,5 g).

Linser hat nun übrigens auch die Ätherextrakte des Schweißes in derselben Weise untersucht wie seine übrigen Ätherextrakte und findet als Säurezahl 6,3, Verseifungszahl 130, Jodzahl 57. Es ist schade, daß Linser diese Zahlen des Schweißfettes nicht mit in seine Tabelle I S. 16, wo sich die sämtlichen Zahlen der Ätherextrakte normaler Hautprodukte befinden, aufgenommen hat. Es würde dann jedem Leser

---

[1]) Es wird nicht angegeben, wie viele Personen wie oft und wie lange geschwitzt haben. Lege ich die Angabe von Kast (Zeitschr. f. physiol. Chem. 1887) zugrunde, wonach er bei drei Personen in 40 Min. 20 l Schweiß sammeln konnte, so macht das pro Person und Stunde: 10 l. Entsprechend der Angabe Linsers würden bei einer solchen Schwitzprozedur pro Person und Stunde: 1,2 g Fett abgesondert. Vergleicht man dieses Ergebnis damit, daß Linser bei einer Person durch tägliche Ätherabreibung des Rumpfes in 3 Wochen nur 1,5 g erhielt, so erscheint die Fettabsonderung während des einstündigen Schwitzens wahrlich nicht klein.

sofort die Übereinstimmung dieser Zahlen mit denen des Hauttalges aufgefallen sein. Diese sind nämlich die folgenden:
Säurezahl 3,4 bis 7,9; Verseifungszahl 117 bis 140; Jodzahl 54 bis 67.

Auch darin stimmte das Schweißfett mit dem Hauttalge Linsers überein, daß beide nur wenig Cholesterin enthielten.

Ich komme mithin bei der Betrachtung nicht der Worte, sondern der Ergebnisse von Linsers fleißigen Untersuchungen zu dem Resultat, daß er uns die durch die Verunreinigungen des Gummisackes[1]) allerdings nicht ganz einwandfreien, aber doch immerhin ersten Angaben über das Schweißfett des Menschen gemacht und gezeigt hat, daß dasselbe sich in seinen Eigenschaften dem durch Ätherbausch von der Oberfläche der Haut abzureibenden Fette ziemlich gleich verhält.

In einem Artikel: Was wissen wir über die Zusammensetzung und Entstehung der fettigen Hautsekrete?[2]) hat neuerdings Siebert versucht, die Arbeiten der Breslauer Schule über das Hautfett zu einem Gesamtbilde zu vereinigen, nämlich die chemischen Arbeiten von Linser und Röhmann und die mikroskopischen von Plato und Stern. Das Eigene an Untersuchungen, was Siebert in dieser Arbeit mitteilt, beschränkt sich auf eine unter Röhmanns Leitung angestellte Nachprüfung der Arbeiten von Darmstädter und Lifschütz über das Wollfett, welche ich schon in der eben zitierten Arbeit: „Über das ‚Lanolin‘ der menschlichen Haut“ besprochen habe. Die Vorstellung, die sich Siebert vom menschlichen Hautfett im allgemeinen gebildet hat, stimmt, wie zu erwarten, der Hauptsache nach mit der von Liebreich und Linser[3]) überein. Nur in betreff der Bedeutung des Cholesterins für die menschlichen Hautsekrete weicht er von Liebreich noch mehr als Linser ab. Er betont: „daß wir dem Cholesterin seine Spezifität für Hautsekrete, wie eine solche früher auf Grund der Untersuchungen von Liebreich angenommen wurde, nehmen müssen . . .“ Es spiele in der Zusammensetzung der menschlichen Hautfette „nur eine ganz nebensächliche Rolle“ (S. 376). Aber in der Hauptsache, in der Annahme, daß die Hautfette sich aus zwei Faktoren: dem cholesterinarmen Talgdrüsensekret und dem cholesterinreichen Oberhautsekret zusammensetzen, steht er bedingungslos und ohne jede weitere Kritik auf der Seite von Liebreich und Linser; das Schweißdrüsenfett ist so weit in den Hintergrund getreten, daß Siebert es gar nicht mehr erwähnt. Anerkennenswert ist andrerseits, daß Siebert in der Eleidinfrage die Untersuchungen von Buzzi berücksichtigt und zu dem Resultat gelangt, daß „weder durch die Untersuchungen von Liebreich, Lewin,

---

[1]) Siehe hierüber meine kritischen Bedenken in: Über das „Lanolin“ der menschlichen Haut. Monatsh. f. prakt. Dermatol. 45, 447, 1907.

[2]) Arch. f. Dermatol. u. Syphilis 82, 371, 1906.

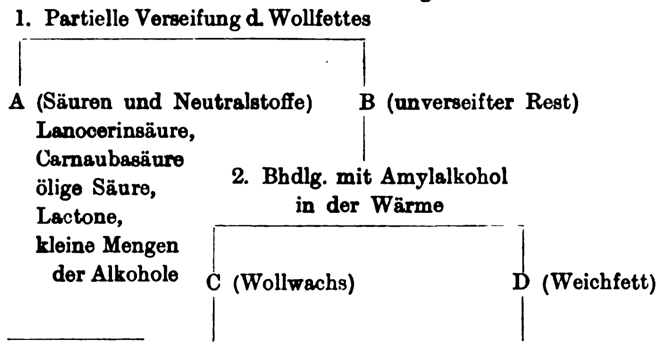
[3]) Beim Zitieren der Resultate von Linser ist Siebert ein Fehler unterlaufen. Er sagt S. 374: Linser habe im Cerumen seinen „Acetonkörper“ nicht gefunden, während er denselben im Cerumen gerade reichlich fand.

Sticker, Selhorst etwas für, noch die von Buzzi und Santi etwas gegen das Vorhandensein von Cholesterinfetten in der Haut bewiesen" sei. Er gibt zu: „Das Eleidin und das Keratohyalin sind also keine Cholesterinester und nach ihren Löslichkeitsverhältnissen überhaupt keine fettartigen Substanzen." Er kann sich aber von der Liebreichschen Idee doch nicht ganz trennen, denn er fährt mit folgendem denkwürdigen Satze fort: „Es ist aber nicht zu leugnen, daß es doch bestimmte Gründe gibt, die dafür sprechen, daß ein gewisser Zusammenhang zwischen Keratohyalin und dem Cholesterin besteht. Vielleicht ist es richtig, was Liebreich auch gelegentlich angedeutet, daß man in dem Keratohyalin gewisse Vorstufen des Cholesterins resp. der Cholesterinester zu sehen hat. Jedenfalls geht das Vorkommen dieser Substanzen, die bekanntlich in einem gewissen Zusammenhang mit den Verhornungsprozessen stehen, in gewissem Sinne parallel."[1]) Wir müssen leider gestehen, daß das „Gewisse" und „Bestimmte" in diesen „Andeutungen" uns bis jetzt noch mehr in den Worten als in den Tatsachen zu liegen scheint und können ebensowenig hierin eine wirkliche Stütze für Liebreichs Anschauung finden wie in der unvermittelten Hereinziehung der Cholesterinester, nachdem im ganzen Artikel tatsächlich nur von Cholesterin die Rede gewesen war und Siebert nicht den Schatten eines neuen, selbständigen Beweises für die Existenz von Cholesterinestern beigebracht hat: „Auf Grund dieser Tatsache[2]) müssen wir also der Epidermis die Fähigkeit zusprechen, Cholesterinester usw. zu bilden, also auch eine gewisse sekretorische Fähigkeit der Epidermis annehmen."

II. Grundlagen der Untersuchung des Hautfettes.

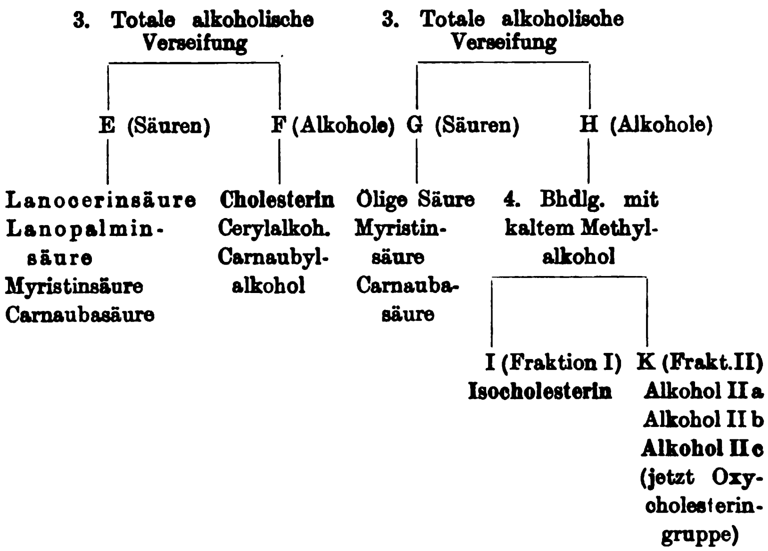
Schon ehe die Arbeiten von Linser und Siebert erschienen, war

die Zusammensetzung des Wollfettes



[1]) Der Sperrdruck dieser Zitate rührt von uns her. Unna und Golodetz.

[2]) Daß nämlich die Zumischung von Hornsubstanz die Hautsekrete reicher an Cholesterin macht.



durch die Bemühungen verschiedener bedeutender Chemiker so weit geklärt, daß die Frage, ob das Hautfett Lanolin, resp. Wollfett enthält, mit Sicherheit entschieden werden konnte. Insbesondere waren es eine Reihe von Arbeiten, welche Darmstädter und Lifschütz in den Berichten der Deutschen chemischen Gesellschaft in den Jahren 1895 bis 1899 publizierten, welche diese Untersuchung zu einer relativ leichten und sehr sicheren machten.[1]) Es stellte sich heraus, daß das Wollfett durch eine Reihe chemisch gut charakterisierter Bestandteile: Isocholesterin, die Gruppe der Cholesterinoxydate, Carnaubylalkohol, Lanocerinsäure, Lanopalminsäure und Chollansäure gekennzeichnet ist. Ihre Anwesenheit beweist das Vorhandensein von Wollfett, ihre Abwesenheit schließt dasselbe aus.

Besonders wertvoll ist es nun, daß einige dieser „kritischen" Stoffe, nämlich Isocholesterin und die Oxycholesterine so scharf und leicht spektroskopisch erkennbar sind, daß sie jeder Ungeübte in einem beliebigen Fettgemisch auffinden und der Geübte sogar annähernd ihr quantitatives Verhältnis bestimmen kann.[2])

[1]) Vgl. Unna und Lifschütz, Zur Kenntnis des Wollfettes. Monatsh. f. prakt. Derm. 45, 234. — Unna, Über das „Lanolin" der menschlichen Haut. Ebenda. S. 379.

[2]) Vgl. Tafel der Spektren der Cholesterine und Lifschütz, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1908, 252 bis 255.

Die Untersuchungen von Darmstädter und Lifschütz ergeben für die Lösung des Isocholesterins in Essigsäureanhydrid auf Zusatz von H_2SO_4 ein ebenso scharfes Spektrum wie es die Liebermannsche Reaktion für die Lösung des Cholesterins besitzt. Lifschütz fand ferner eine besondere Reaktion auf Oxycholesterin, die Eisessig-Schwefelsäure-Reaktion[1]) und wies nach, daß die Lösung bei Anstellung dieser Reaktion ebenfalls ein ihr eigentümliches Spektrum zeigt.

Bekanntlich geht die Farbe der Cholesterinlösung bei Anstellung der Liebermannschen Reaktion vom Rot ins Blau und schließlich ins Grün über. Diesen 3 Stadien entsprechen im Spektrum[2]) bestimmte Absorptionen, die im blauen, grünen, gelben und roten Teile desselben auftreten. Solange das sehr kurze rote Stadium besteht, sehen wir zwei an den Rändern etwas verwaschene Bänder an beiden Grenzen des Grüns. Von denselben verschwindet beim Übergang der Lösung in Blau zunächst der Streifen an der Blauseite des Grüns, während der andere etwas nach dem Gelb zu rückt. Gleichzeitig tritt im Orange (Linie *d*) ein neuer Streifen auf, der die zweite Hälfte des zweiten Stadiums charakterisiert und noch bestehen bleibt, wenn auch das zweite Band im Grün verschwunden ist. Während dieses langsam schwindet, tritt gleichzeitig mit dem Grünwerden der Lösung (drittes Stadium) ein neues Band im Rot (674) auf, etwa dem Zwischenraum zwischen *B* und *C* entsprechend. Dieses wird immer intensiver und zeichnet das sehr dauerhafte grüne Stadium der Lösung hauptsächlich aus. Die Grenze der völligen Absorption nach dem violetten Ende zu beginnt im Grün etwa bei 475 und ist etwas verwaschen (im Gegensatz zum Isocholesterin). Der wichtigste und für die

---

[1]) Man löst wenige Milligramme des Körpers in Eisessig (CH_3COOH, also nicht Essigsäureanhydrid: $\begin{matrix}CH_3CO\\CH_3CO\end{matrix}>O$ wie bei der Liebermannschen Reaktion) und setzt zur kalten Lösung 4 bis 8 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure. Die Flüssigkeit färbt sich ohne Selbsterwärmung schwach rotgelb, wird beim Stehen intensiv grün, um nach 10 bis 15 Stunden durch Grüngelb in Braungelb überzugehen. Weder Cholesterin noch Isocholesterin geben diese Reaktion. S. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 27.

[2]) Vergleiche für das Folgende Tafel I: Die Spektra der Cholesterine.

Diagnose maßgebende Streifen des Cholesterinspektrums ist der tiefdunkle Streifen im Rot, bei etwa 674, welcher 3 bis 4 Stunden nach Anstellung der Reaktion stets vorhanden ist und sehr lange anhält. Sein dem Ultrarot zugewendeter Rand ist stets scharf begrenzt, während der dem Orange zugekehrte Rand weniger scharf abgegrenzt ist. Auch im Spektrum des Oxycholesterins (mit Essigschwefelsäure nach Lifschütz) haben wir zwei Stadien zu unterscheiden, welche dem gelblichroten ersten und intensiv grünen zweiten der Lösung entsprechen, die schließlich in uncharakteristischer Weise braungelb wird. Im ersten Stadium tritt spektroskopisch außer einem verwaschenen, breiten Bande, welches das ganze Gelb und noch einen Teil des Grüns auslöscht, ein zunächst schmaler Streifen im Rot zwischen *C* und *d* auf, etwa bei 640, welcher mit dem Fortschreiten der Reaktion und Färbung immer dunkler wird und das zweite Stadium des Oxycholesterinspektrums charakterisiert. Er fällt nicht zusammen mit dem an ähnlicher Stelle des Spektrums befindlichen Streifen des Cholesterinspektrums, sondern ist wesentlich nach der Orangeseite verschoben (674 gegen 640) derart, daß der eine Streifen[1]) ziemlich genau dort anfängt (*C*), wo der andere aufhört.

Auch die Farbe der Lösung des Isocholesterins bei Anstellung der Liebermannschen Reaktion durchläuft eine Skala, und zwar vom Gelb durch Rotgelb zum Blutrot und schließlich zum Violett. Die Lösungen fluorescieren stark gelblich-grün. Auch die Absorptionen dieser Lösungen haben im Spektrum ihre Lage im Blau, Grün, Gelb und Rot. Von Wichtigkeit für uns ist nur das zweite und dritte Stadium. Im zweiten, der rotgelben Lösung entsprechend, tritt ein Band an der Grenze von Gelb und Grün auf, etwa bei 563, welches an beiden Rändern ziemlich verwaschen ist. Im dritten Stadium wird das Band im Grün und Gelb immer dunkler. Gleichzeitig erscheint ein neuer schwacher Streifen auf *d* im Rot. Die Absorptionsgrenze nach dem violetten Ende beginnt in

[1]) Bei unreinem Material, wo die Farben nicht prägnant auftreten, kann man den charakteristischen Streifen des zweiten Stadiums sofort hervorrufen durch Hinzugeben eines Tropfens Eisenchlorid zur Lösung. (S. Lifschütz, „Oxydationsprodukte in den tierischen Organen." III. Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 175.)

scharfer Weise etwa bei 480. Der wichtigste Streifen für die Diagnose des Isocholesterins ist derjenige an der Grenze von Gelb und Grün, welcher nach 20 bis 30 Minuten auftritt und sich (im Dunkeln) mehrere Tage hält.

Ein besonderer Vorteil dieser spektroskopisch-diagnostischen Methode ist es, daß man bei Vorhandensein von wenig Untersuchungsmaterial bereits in derselben Essigsäureanhydrid-Lösung Cholesterin und Isocholesterin nebeneinander spektroskopisch erkennen kann.

Man könnte meinen, daß schon ein Vergleich der mit bloßem Auge wahrzunehmenden höchst charakteristischen Färbungen, welche bei Ausführung der Liebermannschen und Lifschützschen Reaktionen mit diesen Körpern sich zeigen, für den Zweck der Diagnose genügen würden. Aber diese Färbungen lassen bei Gemischen der Körper, um die es sich doch meistens handelt, im Stich. So wird das Blau des zweiten Cholesterinstadiums bei gleichzeitigem Vorhandensein von Isocholesterin vollkommen verdeckt, so daß die Farbe der Lösung direkt von Rot in Grün übergeht. Da im Lanolin sowohl freies Cholesterin wie Isocholesterin vorhanden ist, vermißt man bei der Cholestolreaktion das typische blaue Stadium des Cholesterins, wie schon Lewkowitsch fand, ebenso wie das blutrote Stadium des Isocholesterins. In der grünen Lösung zeigt sich aber spektroskopisch nebeneinander der charakteristische Streifen im Rot des Cholesterins und der im Grün des Isocholesterins.

Ebenso hat Lifschütz spektroskopisch eine andere für uns sehr wichtige Frage entschieden und eine Nachprüfung, die auf unsere Veranlassung Herr Dr. P. Runge hier vornahm, bestätigte dieselbe durchaus — die Frage nämlich, ob cholesterinfreie Cholesterinester die Liebermannsche Cholestolreaktion geben oder nicht. Denn bekanntlich hatte Liebreich seine Theorie des Lanolingehaltes aller Hornsubstanzen, d. h. des Vorhandenseins von Cholesterinestern oder Cholesterinfetten in denselben, lediglich auf den positiven Ausfall der Cholestolreaktion gegründet. Dieser Schluß erwies sich als durchaus verfehlt. Lifschütz zeigte und Runge bestätigte, daß Wollwachs (der cholesterinhaltige Anteil des Wollfettes), welches durch vielfaches Umkrystallisieren aus Amylalkohol

ganz von freiem Cholesterin gereinigt ist und nur noch Cholesterinester enthält, die Cholestolreaktion nicht mehr gibt, daß dagegen nach Verseifung dieses cholesterinfreien Wollwachses, wodurch neues Cholesterin aus den Cholesterinestern in Freiheit gesetzt wird, sofort auch die Cholestolreaktion in scharfer Weise wieder auftritt. Dasselbe wie für die aus dem Wollwachs hergestellten, cholesterinfreien Cholesterinester gilt auch für die künstlich von uns aus Cholesterin und Fettsäuren hergestellten, reinen Cholesterinester. Man darf also in Zukunft aus dem positiven Ausfall der Liebermannschen Cholestolreaktion immer nur, wie es früher üblich war, auf die Existenz des Cholesterins schließen, nicht aber, wie es Liebreich tat, auf die Existenz von Cholesterinestern (Cholesterinfetten).

Damit ist die ganze durch Liebreich aufgeworfene, komplexe Frage in die zwei Einzelfragen geteilt, die einzeln heutzutage in einwandfreier und einfacher Weise beantwortet werden können, nämlich:

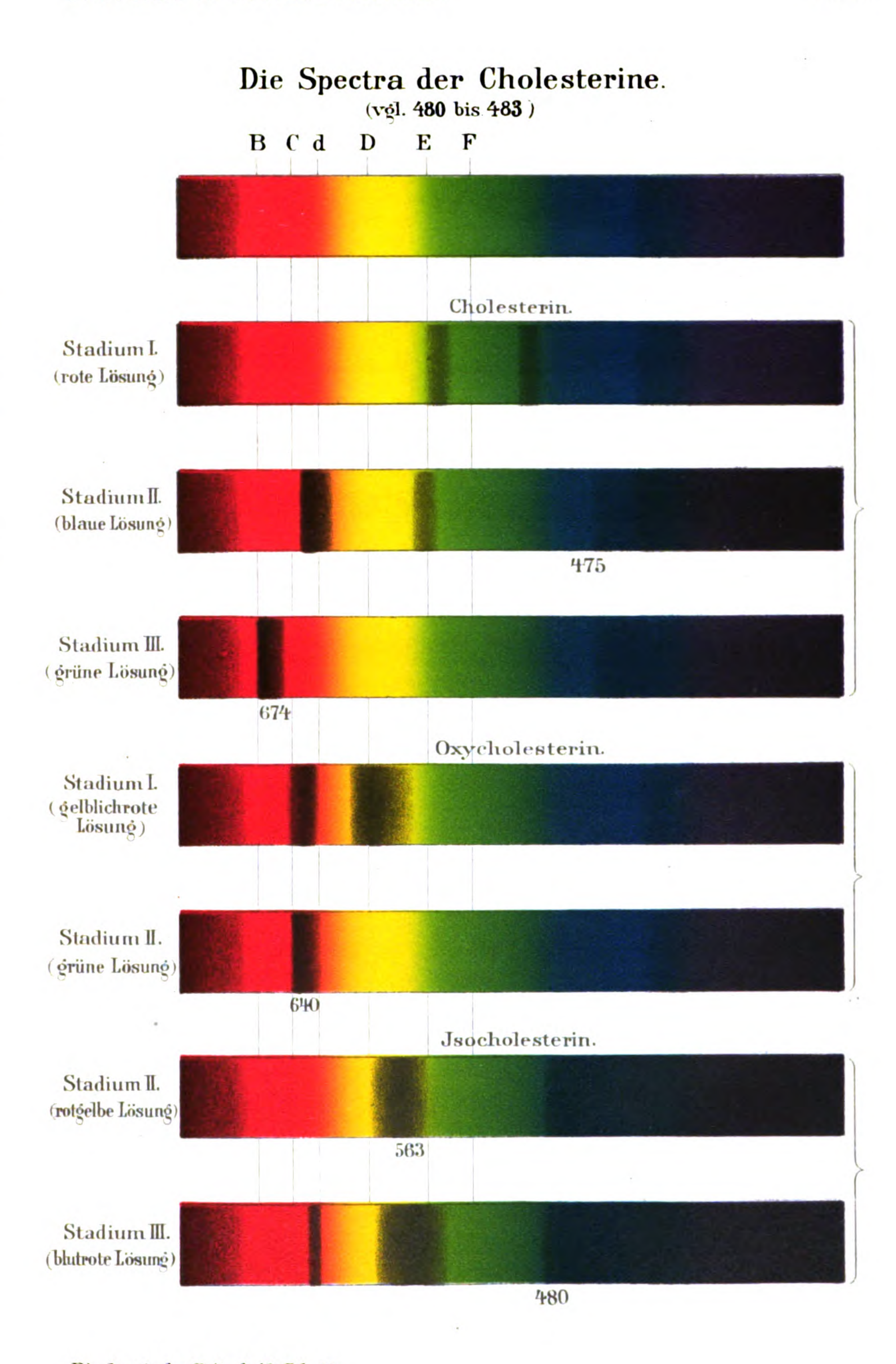
1. Enthält ein Hautfett die charakteristischen Bestandteile des Wollfettes (Oxycholesterin, Isocholesterin, Lanopalminsäure, Lanocerinsäure, Chollansäure usw.)? und

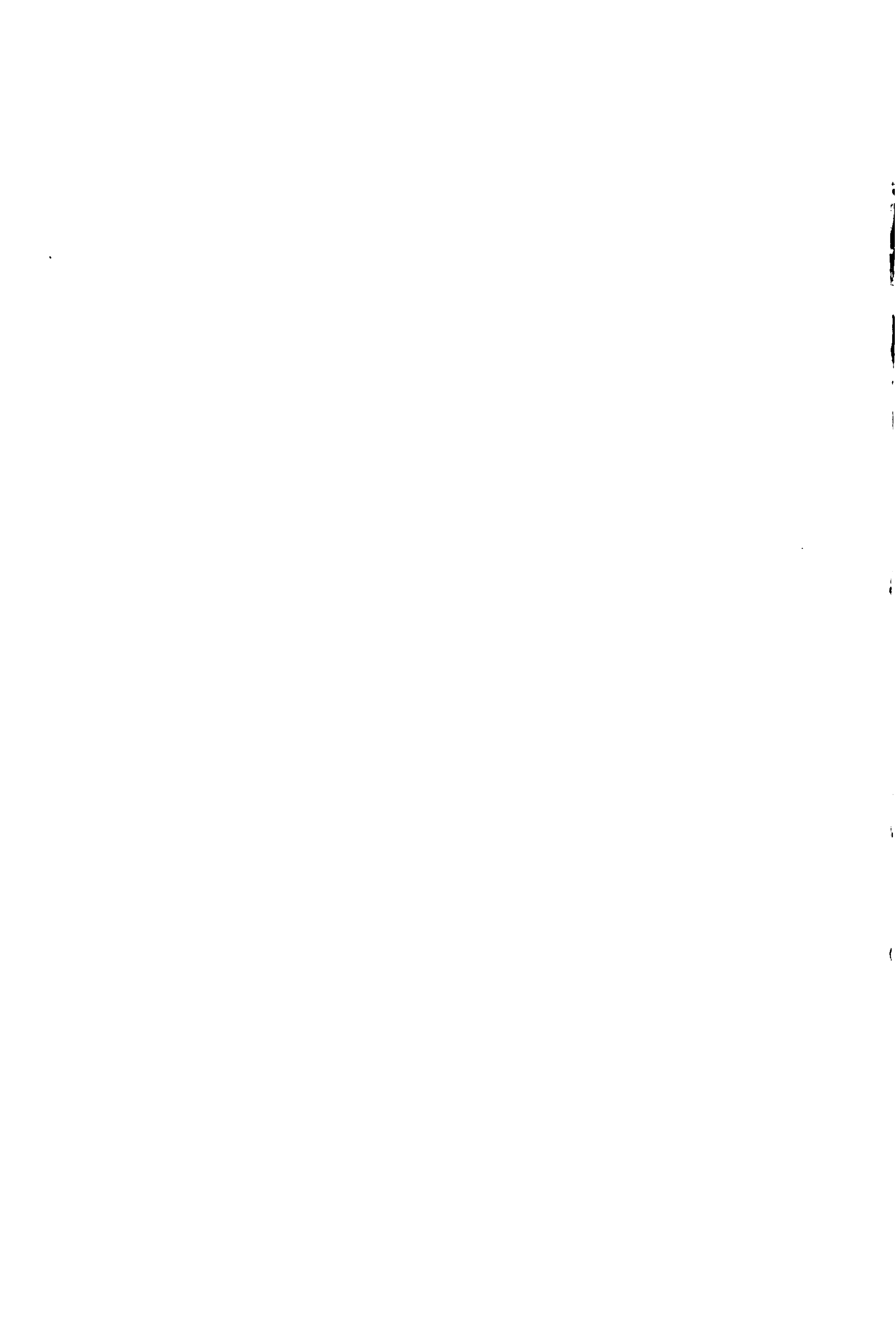
2. Enthält ein Hautfett neben Cholesterinen die entsprechenden Cholesterinester oder nicht?

III. Technik der Untersuchung des Hautfettes.

Wenn entschieden werden soll, ob ein bestimmtes tierisches Fett Wollfett enthält oder so nahe verwandt mit dem Wollfett ist, daß wir es selbst als ein Wollfett (Lanolin) bezeichnen können — wie Liebreich es in bezug auf das Oberhautfett der Haut behauptete —, so ist zunächst zu untersuchen, ob es bei der Liebermannschen Reaktion neben dem Cholestolspektrum das Spektrum des Isocholesterins und bei der Lifschützschen Reaktion das der Oxycholesterine gibt. Fallen diese Reaktionen positiv aus, so ist ein dem Wollfett verwandtes Fett vorhanden, ist nur eine von ihnen negativ, so kann von Wollfett keine Rede sein.

In letzterem Falle ist es aber immerhin möglich, daß Cholesterinfette (Cholesterinester), die — wie jetzt im


Die Spectra der Cholesterine.
(vgl. 480 bis 483)
B C d D E F
Cholesterin.
Stadium I. (rote Lösung)
Stadium II. (blaue Lösung)
475
Stadium III. (grüne Lösung)
674
Oxycholesterin.
Stadium I. (gelblichrote Lösung)
Stadium II. (grüne Lösung)
640
Jsocholesterin.
Stadium II. (rotgelbe Lösung)
563
Stadium III. (blutrote Lösung)
480



Gegensatz zu Liebreich feststeht — nicht mit dem Lanolin oder dem Wollfett überhaupt identifiziert werden dürfen, in dem betreffenden tierischen Fett vorhanden sind, und zwar neben dem Cholesterin, welches, wie wir schon seit langem durch Hoppe-Seyler und Burchardt wissen, in jeder tierischen Zelle gefunden wird.

Um diese Frage zu entscheiden, muß der Ätherauszug[1]) des betreffenden Fettes, welcher neben Cholesterin (und anderem Unverseifbarem) auch die eventuell vorhandenen Cholesterinester enthält, mit alkoholischer Kalilauge verseift werden, wobei etwa vorhandene Cholesterinester ihr Cholesterin abgeben. Steigt nach der Verseifung im Vergleich zum unverseiften Fett der Cholesteringehalt, so waren in letzterem neben freiem Cholesterin auch Cholesterinester vorhanden; bleibt der Gehalt an Cholesterin derselbe, so war überhaupt nur freies Cholesterin da. Ein Steigen des Cholesteringehaltes läßt sich nun durch Anstellung der Liebermannschen Reaktion und vergleichende Untersuchung der Intensität der Spektra sicher erkennen, am besten unter Zuhilfenahme des Vergleichsprismas (Methode von Lifschütz)[2]), wie es weiter unten genauer geschildert werden wird.

Die Untersuchung der im folgenden einzeln besprochenen Fette, deren Ergebnisse weiter unten in einer Tabelle vereinigt sind, geschah nach einem und demselben Schema.

Die Fette wurden meist durch Extraktion der dieselben enthaltenden Objekte (Watte, Haut usw.) mit Äther im Soxhlet gewonnen. Nach Verdunsten des Äthers wurde der Rückstand eventuell unter Zusatz von Alkohol so lange auf dem Wasserbade erwärmt, bis jede Feuchtigkeit oder Wasser entfernt war. Behufs Schmelzpunktbestimmung wurde in das geschmolzene

---

[1]) Dieser Auszug muß neutral sein, da bei Gegenwart von überschüssigen Fettsäuren die Liebermannsche Reaktion ausbleibt. Man muß daher bei sich ergebender Säurezahl den Ätherauszug nach Wiederauflösung in Äther vorsichtig neutralisieren und dann erst wie oben behandeln. Siehe folgende Seite, Anm. [1]).

[2]) Herr Dr. Lifschütz hatte die Güte, uns in seiner Methode persönlich zu unterweisen und unsere Resultate zu kontrollieren. Wie er uns mitteilt, wird er demnächst die Technik seiner spektrometrischen Bestimmungen des Cholesterins in Gemischen in einer eigenen Arbeit veröffentlichen.

Fett ein beiderseitig offenes capillares Röhrchen eingetaucht, wobei dasselbe etwas Fett aufsog. Nach Erstarren des Fettes im Röhrchen wurde 24 Stunden später der Schmelzpunkt im Wasser in üblicher Weise am Thermometer bestimmt, wobei als Schmelzpunkt die Temperatur galt, bei der das Aufsteigen der Substanz im Röhrchen begann.

Der weitere Gang der Untersuchung war nun der folgende: Eine gewogene Menge des Fettes wurde in einem Kölbchen in absolut neutralem Äther gelöst und mit $^n/_{10}$ alkoholischer Kalilauge gegen Phenolphthalein genau neutralisiert.[1]) Die hierfür verwendete Menge Kalilauge ergibt die Säurezahl. Der Inhalt des Kölbchens kam sodann in einen Scheidetrichter mit etwa der gleichen Menge verdünnten Alkohols und wurde ordentlich durchgeschüttelt. Nachdem sich die beiden Schichten geklärt hatten, wurden sie voneinander getrennt und jede für sich gut gewaschen, und zwar die obere ätherische Lösung mit verdünntem Alkohol, um von Seifenbeimengungen, die untere Seifenlösung mit Äther, um von Fettresten befreit zu werden. Die ätherische Lösung enthielt dann den gesamten neutralen Anteil des Fettes nebst den etwaigen unverseifbaren Stoffen. Nach Verdunsten des Äthers und Trocknen des Rückstandes wurde letzterer gewogen. Zur quantitativen Bestimmung des Cholesteringehaltes wurde eine kleine Menge (10 bis 20 mg) des Neutralfettes abgewogen, in 4 ccm Essigsäureanhydrid gelöst und mit 1 Tropfen konzentrierter H_2SO_4 versetzt. Zum Vergleich diente eine 0,05 % Cholesterin enthaltende Essigsäureanhydridlösung. Nach etwa 1 Stunde[2]) wurden beide Lösungen in gleich kalibrierten Reagiergläsern vor das mit Vergleichsprisma versehene Spektroskop gestellt und die Intensität des Streifens im Rot geprüft. Die intensiver gefärbten Lösungen wurden sodann vorsichtig mit Essigsäureanhydrid so weit verdünnt, bis die Intensität der übereinander liegenden Absorptions-

[1]) Die genaue Absättigung und Beseitigung der freien Fettsäuren wurde deshalb absolut notwendig, weil auch das Spektrum der Cholesterine bei gleichzeitiger Anwesenheit freier Fettsäuren bis zur Unkenntlichkeit geschädigt wird.

[2]) Die Vergleichungen dürfen nicht eher begonnen werden, als bis die Absorptionen der ersten Stadien verschwunden sind und der Streifen *B* bis *C* allein klar und deutlich sichtbar wird.

streifen völlig gleich geworden war. Durch Berechnung konnte man dann die Menge des Cholesterins im Unverseifbaren ermitteln, in analoger Weise etwa wie Hämoglobinmengen colorimetrisch bestimmt werden. Ein anderer Teil des Fettes, wozu 150 mg schon genügen, wird zur Verseifung benutzt. Eine gewogene Menge wird in Benzin gelöst; mit der Benzinlösung wird durch Titration mit $^{n}/_{10}$ alkoholischer Kalilauge die Säurezahl bestimmt. Darauf wurde die Benzinlösung zum Verdunsten gebracht, der Rückstand mit einer passenden Menge $^{n}/_{2}$ alkoholischer Kalilauge versetzt und in einem Kölbchen mit Rückflußkühler etwa $^{3}/_{4}$ Stunden auf dem Wasserbade im Sieden erhalten. Das Verseifungsprodukt wurde sorgfältig in einen Scheidetrichter gebracht, mit Wasser versetzt und mit Äther geschüttelt. Die ätherische Lösung wurde getrennt, die Seifenlösung nochmals ausgeäthert und die gesamte ätherische Lösung nach wiederholtem Auswaschen mit verdünntem Alkohol und Filtrieren durch einen Doppelfilter zum Verdunsten gebracht. Das Gewicht des Rückstandes ergab die Menge des unverseifbaren Teiles.

Die Seifenlösung wurde in der Wärme mit Salzsäure angesäuert und die ausgeschiedenen Säuren in Äther aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wurde die ätherische Lösung getrennt, zum Verdunsten gebracht und der Rückstand gewogen. Das Gewicht ergab die Menge der Fettsäuren. Mit demselben Rückstand wurde durch Auflösen in Benzin und Titration mit $^{n}/_{10}$ alkoholischer Kalilauge die Säurezahl der Fettsäuren (= Gesamtsäurezahl) festgestellt. 20 mg vom Unverseifbaren wurden sodann zur quantitativen Bestimmung des Cholesteringehaltes in derselben Weise, wie vorhin geschildert, benutzt.

Die Prüfung auf Oxycholesterine geschah nach der Lifschützschen Eisessig-Schwefelsäure-Reaktion.

IV. Die Hautfette.[1])

Die vorliegende Arbeit über die menschlichen Hautfette ist die positive Ergänzung zu der vor zwei Jahren erschienenen

[1]) Den Herren Dr. v. Veress, Dr. Ferd. Winkler, Dr. Delbanco, Dr. Engelmann, Frau Dr. Schwenter-Trachsler und Prof.

Arbeit aus unserem Laboratorium „Über das ‚Lanolin' der menschlichen Haut"[1]), welche sich die genaue Nachprüfung der Angaben Liebreichs über diesen Gegenstand zum Ziele setzte und zu dem wesentlich negativen Resultate gelangte, daß die menschliche Haut kein Wollfett (und Lanolin) enthält. Diese Vorarbeit war durchaus nötig, um die Bahn für eine Einsicht in die Natur der wirklichen Hautfette frei zu machen, auf welcher die mehrfach bezweifelten und kritisierten, aber nie vollständig als falsch erwiesenen Behauptungen Liebreichs seit 1885, d. h. seit beinahe einem Vierteljahrhundert, jedem Fortschritte den Weg versperrend, lasteten.

Die damals gesammelten 6 Hautfette, Vernix caseosa, Ohrenschmalz, Subcutisfett, Cutisfett, Epidermisfett und Nagelfett, genügten zu dieser negativen Feststellung, gaben aber, da es sich bei allen 6 Fetten um Mischungen der Fette verschiedener Fettquellen (Sekretion der Talgdrüsen, Sekretion der Knäueldrüsen, Fett der Oberhautzellen) handelte, noch keinen Aufschluß über die einfachen, reinen Hautfette selbst. Da diese nur unter ziemlichen Schwierigkeiten in genügender Menge gesammelt werden können, so dauerte die Gewinnung positiver Daten, wie wir sie im folgenden zum ersten Male geben, längere Zeit, als wir ursprünglich ahnten. Dieses Hinausschieben des Abschlusses durch äußere Schwierigkeiten kam jedoch der Arbeit selbst zugute, denn wir konnten inzwischen die weiteren Erfahrungen des auf diesem Gebiete kompetentesten Forschers, des Herrn Dr. Lifschütz[2]) verwerten.

Auf das Resultat der früheren Arbeit über das „Lanolin" der menschlichen Haut bleiben diese neu gewonnenen Erfahrungen insofern ohne Einfluß, als daselbst die Abwesenheit des Wollfettes nicht bloß aus der Abwesenheit des Oxycholesterins in den gemischten Hautfetten geschlossen wurde, sondern auch aus der des Isocholesterins, welches tatsächlich in keinem Wollfett fehlt und in keinem Hautfett vorkommt.

Mibelli, welche uns mehrfach Material für diese Untersuchung zur Verfügung stellten, unsern herzlichsten Dank.

[1]) Unna, Über das „Lanolin" der menschlichen Haut. Monatshefte f. prakt. Derm. 45, 379, 1907.

[2]) Lifschütz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 142, 1907 und daselbst 58, 177, 1908. — Ferner Unna und Lifschütz, Zur Kenntnis des Wollfettes. Monatshefte f. prakt. Derm. 45, 234, 1907.

Wir haben unsere Resultate in einer am Schlusse gegebenen Tabelle zusammengestellt, welche aus den verbesserten früheren Resultaten über die 6 gemischten Hautfette als wesentlich Neues die Eigenschaften dreier reiner Hautfette enthält, des Talgdrüsenfettes, des Knäueldrüsenfettes der Fußsohle und des Knäueldrüsenfettes der Hohlhand.

1. Das Fett der Talgdrüsen.

Es gibt am menschlichen Körper keine einzige Region, welche nur Talgdrüsen als fettsezernierende Organe besäße. Daher ist die Gewinnung des reinen, unvermischten Talgdrüsenfettes oder kurz gesagt: des Talges beim Menschen mit Schwierigkeit verbunden.

Freilich wissen wir, daß die eigentliche und hauptsächliche Funktion des Talges die Einfettung der Haare ist; denn die Talgdrüse ist nur ein umgewandeltes Stück des Haarbalgepithels und der Nachweis ist mikroskopisch leicht zu erbringen, daß der Talg sich kontinuierlich von den Talgdrüsen aus auf die Cuticula des Haares fortsetzt. Es läge daher der Gedanke nahe, einfach durch Entfettung der langen Körperhaare, z. B. bei Frauen, Talg zu gewinnen. Aber einerseits würden wir dann als Verunreinigung ev. in der Hornsubstanz des Haares autochthon erzeugte Fette — deren Existenz noch nicht erwiesen, aber möglich ist — in den Kauf nehmen, andererseits aber sicher auch Fette, die aus den Knäueldrüsen herrühren, da wir wissen, daß bei jedem Schwitzen die stark hygroskopischen Haare Schweißwasser und damit auch Schweißfett ansaugen.

Wir sind somit auf solche Regionen angewiesen, an denen die Haare keine Rolle spielen, die Talgdrüsen dagegen an Masse vorwiegen und zugleich eine lebhafte Sekretion erkennen lassen, und müssen dann versuchen, Verunreinigungen möglichst fern zu halten. Als solche Regionen kennen wir die Gesichtshaut und die Glatze, erstere im Zustande der Seborrhoe, letztere als Folgezustand der Alopecia seborrhoica (pityrodes), dürfen aber nicht vergessen, daß an beiden Regionen auch sehr viele Knäueldrüsen münden.

Linser hat bereits versucht, von der Haut bei Seborrhoea oleosa Talg zu gewinnen, und zwar durch Abreiben der Haut

mittelst eines Petrolätherbausches, da er ja das Knäueldrüsenfett vernachlässigen zu können glaubte. Auf diese Weise wird man natürlich nie reinen Talg bekommen, sondern ein Gemisch von Talg mit Schweißfett und dem (noch hypothetischen) Oberhautfett.

Denselben Einwurf müßten wir auch einer Gewinnung des Talges von stark fettigen Glatzen machen, da auch hier nur eine solche durch Abreiben der Haut, nicht durch Ausdrücken der einzelnen Talgdrüsen möglich ist.

Anders verhält es sich mit der Gesichtshaut, weil deren vergrößerte Talgdrüsen sich bekanntlich, besonders an der Nase, leicht einzeln ausdrücken lassen; dieses ist mithin die einzige Region, welche unter gewissen Kautelen uns reinen Hauttalg liefern kann. Man hat hier zwei Fälle zu unterscheiden. Entweder handelt es sich (bei Seborrhoe) um offene, unter Umständen weit klaffende Follikel, die bei leichtem Druck schon eine Menge Fett in Form weißlicher Cylinder entleeren. Hier ist die oberste, zuerst austretende Fettmasse — als sicher durch Schweißfett verunreinigt — von der unteren, später austretenden zu trennen. Oder es handelt sich um Fälle von Akne juvenilis, wo beim Ausdrücken der Comedonen eine größere Menge reinen Hauttalges nachfolgt. Auch hier hat man die verhornte, schwärzliche Spitze des Mitessers — weil durch eventuelles Oberhautfett verunreinigt — abzutrennen.

Beide Arten der Talganhäufung haben das Gemeinsame, daß sie durch eine Aufspeicherung des reinen Talges im Balge direkt oberhalb der Drüse entstehen. Am meisten vertrauenerweckend ist der Fettschwanz der Comedonen, da derselbe mit Sicherheit unter Abschluß der Atmosphäre zustande kam. Das Einzige, was man meines Erachtens gegen diese natürlichen Talganhäufungen als eine Quelle für die Gewinnung normalen Talges einwenden könnte, ist, daß sie das Produkt einer Stauung sind, und daß das längere Zeit im Körper stagnierende Sekret vielleicht Veränderungen eingehen kann. Es handelt sich bei dieser Art der Gewinnung also sicher um reinen, aber vielleicht um durch Stagnation etwas veränderten Talg. Übrigens läßt sich mit den bisherigen mikroskopischen Mitteln ein Unterschied zwischen dem normalen Talg, der an der Mündung der Talgdrüse das Haar umgibt und dem gestauten Talg nicht konstatieren.

Wir empfehlen also in erster Linie zur chemischen Untersuchung des Talges das angestaute Sekret am Ende der ausgedrückten Mitesser bei Akne, nachdem es vom Kopfende der Comedonen getrennt ist, in zweiter Linie die vom obersten Teil abgetrennten Talgcylinder, die bei Seborrhoe aus der Gesichtshaut, besonders der Nasenhaut, ausdrückbar sind. Dieses Talgmaterial, wie ich es aus den Comedonen gewinne, ist nicht mit dem Fett zu identifizieren, welches den eigentlichen Comedo, nämlich dessen Hornkörper infiltriert, und demgemäß sind meine Fettzahlen auch nicht mit denjenigen in Parallele zu stellen, welche Linser durch Extraktion ganzer Comedonen gewann.

Die mit durch Äther oder Benzin gereinigten Instrumenten entnommenen Talgklümpchen werden am besten direkt in ein mit Äther[1]) gefülltes Gläschen überführt und dort aufbewahrt und gesammelt.

Das so gewonnene reine Talgdrüsensekret (Gesamtausbeute 0,211 g) zeichnet sich durch helle Farbe (gelblich-weiß), talgartige Konsistenz und verhältnismäßig hohen Schmelzpunkt (53°) aus.

Die Analyse ergab folgende Zahlen:

Unverseifbarer Teil 30,5%,
wasserunlösliche Fettsäuren 44,9%,
Gesamtsäurezahl 202[2]).
Cholesteringehalt im Unverseifbaren 9,16%,
„ berechnet auf das ganze Talgdrüsensekret 2,8%,
Oxycholesterin fand sich in besonders großer Menge vor, dagegen
kein Isocholesterin.

---

1) Der Äther darf beim Verdunsten auf dem Uhrglas keinen Rückstand hinterlassen.

2) Gesamtsäurezahl bedeutet diejenige Anzahl Milligramm Normal-Kalilauge, welche durch 1 g der durch die Verseifung isolierten gesamten Fettsäuren neutralisiert wird. Im Gegensatz dazu bezeichnet man mit Säurezahl diejenige Zahl KOH, welche durch 1 g eines Fettes, das durch spontanes Ranzigwerden freie Fettsäuren enthält, neutralisiert wird. Die Säurezahlen wurden ebenfalls von uns bestimmt, aber als wertlos nicht mit angeführt, weil sie während der langen Dauer der Aufbewahrung der Fette sich fortdauernd veränderten.

2. und 3. Knäueldrüsenfett der Fußsohle und der Hohlhand.

Knäueldrüsenfett läßt sich leichter rein gewinnen als Talgdrüsenfett, da wir zwei Regionen der Haut besitzen, welche nur durch Knäueldrüsenfett eingefettet werden: die Fußsohle und die Hohlhand.

Zur Gewinnung des Knäueldrüsenfettes der Fußsohle hat sich am besten folgende Methode bewährt: Von baumwollenen oder wollenen Strümpfen schneidet man die Sohlenteile ab, indem man dafür sorgt, daß noch ein aufsteigender Rand von etwa 2 cm Breite an der Sohle verbleibt. Die so erzeugte Sandale, die durch Umsäumen der Kante die nötige Festigkeit erhält, entspricht am Fuße der Region der Knäueldrüsen. Durch Überziehen eines zweiten, etwas größeren Strumpfes derselben Art haftet sie, auch beim Gehen, fest am Fuße. Vor dem Gebrauche werden sowohl die Sandalen wie die Überstrümpfe in einem großen Soxhlet[1]) sorgfältig entfettet, da die wollenen Strümpfe stets Fett und Cholesterin, die baumwollenen Fett und Phytosterin enthalten und dadurch die exakte Bestimmung des Hautfettes unmöglich machen. Durch diese Beseitigung ihres natürlichen Fettes werden die Strümpfe und Sandalen sehr hart und trocken, erhalten aber durch 24stündigen Gebrauch wieder die frühere Geschmeidigkeit, indem sie nun Hautfett einsaugen. Die Überstrümpfe nehmen auch durch die porösen Sandalen hindurch etwas Fett auf, werden aber nicht zur Darstellung des Hautfettes benutzt, sondern dienen nur dazu, einerseits die Sandalen in ihrer Lage zu erhalten, andererseits dieselben vor Beschmutzung durch die Stiefel zu schützen. Nachdem die Sandalen und Überstrümpfe einige

[1]) Auf unsere Bitte hat Herr Dr. Lifschütz (Bremen) diese Extraktionen übernommen, da diese sich einwandfrei nur mit großen Laboratoriumsapparaten, welche $^1/_2$ kg Material auf einmal mit derselben Quantität Äther erschöpfen, ausführen lassen. Wir sagen diesem ausgezeichneten Forscher für seine technische Unterstützung, sowie für seine äußerst wertvollen Ratschläge und sein nie versagendes freundliches Interesse an unserer Arbeit unsern herzlichsten Dank. Ganz besonders sind wir ihm für die persönliche Anweisung und Kontrolle der mit dem Vergleichsprisma angestellten Untersuchungen, die eine große Erfahrung in spektroskopischen Arbeiten erfordern, zu Dank verpflichtet.

Tage (und ev. Nächte) getragen sind und sich fettig anfühlen, werden sie wieder im Soxhlet entfettet und können ev. ein zweites Mal zur Verwendung gelangen.

Die Gewinnung des Schweißfettes der Hohlhand kann auf zwei Weisen erfolgen. Entweder durch periodisches Abreiben der Hohlhand mittelst eines trockenen Bausches gut (im Soxhlet) entfetteter Watte. Diese Methode wird nur dann ergiebig, wenn sichtbarer Schweiß abgesondert wird, also bei höherer Außentemperatur (im Sommer, stark geheiztem Zimmer). Am meisten gewinnt man, wenn die Hohlhände den Wattebausch beständig fest umfassen, wobei sie sich erwärmen und dann von Zeit zu Zeit durch Hin- und Herrollen desselben Wattebausches trocken gerieben werden. Die andere Methode ist analog der Schweißfettgewinnung von der Fußsohle. Man umfaßt vor dem Zubettgehen mit beiden Händen je einen entfetteten Wattebausch, schließt die Hände zur Faust und zieht über letztere und den ganzen Arm einen gut und eng anschließenden Strumpf, der die ganze Nacht sitzen bleibt und die Hand in geschlossenem Zustande erhält.

Es versteht sich von selbst, daß man vor jeder Schweißfettgewinnung die Haut — ganz besonders gilt das von den Händen — von allen Spuren fremden Fettes befreien muß. Das geschieht am einfachsten durch gutes und starkes Abseifen, wobei man nur durch langes Nachspülen dafür Sorge zu tragen hat, daß keine Seifenreste — die ja Fett enthalten — auf der Haut bleiben. Eventuell reibt man nach der Abseifung und Abtrocknung die Haut noch einmal mit Äther oder Benzin ab.

Das Fett des Fußschweißes (in einer Ausbeute von mehr als 2 g) zeichnet sich aus durch seine braune Farbe, weiche Konsistenz und niedrigen Schmelzpunkt (36,5°).

Die Analyse gab folgende Zahlen:

Neutralfett 62,3 %, Unverseifbares 22,3 %,
Fettsäuren 59,7 %, Gesamtsäurezahl 188,
Cholesteringehalt vor Verseifung 2,55 %,
" nach " 4,17 %,
Oxycholesterin ziemlich viel,
kein Isocholesterin.

Das Fett des Handschweißes (Ausbeute beinahe 1 g) ist

heller, gelbbräunlich, von wachsartiger Konsistenz und dem Schmelzpunkt 46,5°.

Analyse:

Neutralfett 71,4%, Unverseifbares 28,4%,
Fettsäuren 55,4%, Gesamtsäurezahl 192,
Cholesteringehalt vor Verseifung 0,64%,
„ nach „ 1,43%,
Oxycholesterin sehr wenig,
Isocholesterin fehlt.

4. und 5. Oberhautfett und Hornschichtfett.

Die Gewinnung des Oberhautfettes geschieht auch am einfachsten durch Verarbeitung der Fußsohlenoberhaut und zwar kann man auf zwei verschiedene Weisen dabei verfahren. Entweder trägt man von den schwieligen Stellen der Fußsohlenfläche Schnitte mit dem Rasiermesser ab oder man benutzt die ganze Fußsohlenhaut und maceriert dieselbe mit sehr schwacher Essigsäure (1‰), wobei die gesamte Oberhaut, also Horn- und Stachelschicht zusammen, sich als einheitliche Schicht von der Cutis ablöst. Eine solche Prozedur dauert nur 1 bis 2 Tage. Im ersteren Falle gewinnt man die Hornschicht allein, im zweiten Falle außer dieser auch die unverhornten Stachelzellen. Bei der Extraktion gewinnt man aus ersterer: das Fett der Hornschicht, aus letzterer: das Fett der gesamten Oberhaut.

Der Ätherextrakt der Hornschicht (0,31 g) stellt eine gelbliche Masse dar, ziemlich ähnlich, aber wesentlich heller als das Knäuelfett der Fußsohle. Die Konsistenz ist wachsartig, der Schmelzpunkt durchschnittlich 51°.

Der Ätherextrakt der Oberhaut (0,68 g) ist dunkler, bräunlich und riecht, obwohl die Oberhaut nach der Maceration mit Essigsäure gut gewaschen und getrocknet war, immer noch sehr schwach nach Essigsäure. Die Konsistenz ist wachsartig, der Schmelzpunkt bei drei Versuchen konstant etwas niedriger als bei der Hornschicht allein, nämlich 48 bis 49°.

Die Analyse der beiden Fette ergab für

Oberhautfett:		Hornschichtfett:	
Neutralfett	88,4 %	Neutralfett	83,7 %
Unverseifbares	32,2 %	Unverseifbares	36,35 %
Fettsäuren	54,75 %	Fettsäuren	52,21 %
Gesamtsäurezahl	181,5	Gesamtsäurezahl	172

Cholesterin:		Cholesterin:	
vor Verseifung	14,04 %	vor Verseifung	10,71 %
nach Verseifung	16,1 %	nach Verseifung	19,62 %
Oxycholesterin	0	Oxycholesterin	0
Isocholesterin	0	Isocholesterin	0

6. Nagelfett.

Nagelschnitzel im Gewichte von 15 g wurden mit Wasser gewaschen, getrocknet und zunächst im Soxhlet mit Äther extrahiert. Die Menge des Fettes betrug 0,137 g; Schmelzpunkt 38°. Da der Nagel ein viel zu kompakter, harter Stoff ist, um durch Äther ganz erschöpfend ausgezogen zu werden, so erschien es notwendig, die Nagelsubstanz durch Alkali aufzulockern und erst dann nochmals zu extrahieren. Zu diesem Zwecke wurden die Nagelschnitzel nach der erstmaligen Extraktion mit Äther mit 8 % NaOH übergossen. Nach einem Tage waren die Nägel teilweise gelöst, teilweise sehr gequollen. Die Flüssigkeit wurde sodann mit dem dreifachen Volum Wasser verdünnt und in einen Scheidetrichter gebracht. Auf Zusatz von Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion entstand eine weiße Fällung [Keratin B und Albumosen[1])]. Nun wurde der Inhalt mit Äther geschüttelt und darauf die Flüssigkeit (Wasser + Äther) filtriert. Im Filtrat trennte sich die ätherische Schicht klar ab und wurde von der unteren, wässerigen Schicht abgehoben. Der Niederschlag, der also die Nagelsubstanz in zerlegter Form enthielt, wurde getrocknet und dann wiederum im Soxhlet mit Äther extrahiert. Die erhaltene ätherische Lösung wurde mit der soeben abgehobenen vereinigt und zusammen zum Verdunsten gebracht. Hierbei schieden sich schöne lange, blaßgelbe, spröde Krystalle in flachen Prismen neben einer kleinen Menge amorpher, fettiger Substanz aus. Die gelben Krystalle für sich waren in Wasser unlöslich und sehr schwer löslich in Methylalkohol. Da im Rückstand offenbar ein Gemisch von Fett und Nichtfett vorlag, so wurde derselbe mit kaltem Methylalkohol ausgezogen, die zurückgebliebenen gelben Krystalle auf ein Filter gebracht und mit Methylalkohol nachgewaschen. Bei näherer Betrachtung erwiesen sich die trockenen Krystalle als

---

1) Siehe Unna und Golodetz, Neue Studien über die Hornsubstanz. Monatshefte f. prakt. Derm. 47, 62, 1908.

gediegener Schwefel.[1]) In der Tat verbrennen die Krystalle auf Platinblech mit bläulicher Flamme ohne Rückstand zu Schwefeldioxyd.

Das methylalkoholische Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand getrocknet. Das Gewicht des Rückstands betrug 0,0471 g. So wurden also von den Nägeln zwei Extrakte erhalten. Sie wurden vereinigt und zusammen analysiert.

Analyse:

Unverseifbares 41,64%,
Fettsäuren 50,2%,
Cholesteringehalt nach Verseifung 19,62%,
Oxycholesterin ziemlich viel,
Isocholesterin fehlt.

Zur Gewinnung weiterer Daten — Bestimmung des Neutralfettes und dessen Cholesteringehalts — reichte das Material nicht mehr aus.

7. Vernix caseosa.

Das Fett der Vernix caseosa wurde gewonnen durch Abstreichen von der Haut des Neugeborenen mittelst Glasspatels und sofortiges Eintragen in Alkohol. Die Masse wurde sodann filtriert, getrocknet und darauf im Soxhlet mit Äther ausgezogen. Der nach Verdunsten des Äthers hinterbliebene Rückstand (3,5 g) stellte eine weiße, weiche Masse vom Schmelzpunkte 38 bis 39° dar.

Die Analyse ergab:

Neutralfett 92,6%,
Unverseifbares 36%,
Fettsäuren 60%,
Gesamtsäurezahl 188,
Cholesteringehalt vor Verseifung 7,82%,
„ nach Verseifung 16.2%,
Oxy- und Isocholesterin fehlen.

[1]) Diese Erscheinung ist aber durchaus nicht überraschend. Wie Herr Dr. Lifschütz uns mitteilt, stieß er oft während seiner Tätigkeit in der Norddeutschen Wollkämmerei bei der Isolierung des Wollfettes auf gediegenen Schwefel, und zwar fand er diesen regelmäßig in schön ausgebildeten Krystallen durch Extraktion des aus den Wollwaschwässern abgesetzten sandigen Schlammes. Der Schwefel rührt zweifellos hier wie da aus dem lockeren Schwefel der Hornsubstanzen (Nägel resp. Wolle) von der Einwirkung von Alkali her.

8. Ohrenschmalz.

Das Ohrenschmalz wurde gewonnen durch Ausspritzen des Gehörganges mit Sodalösung und Eintragen der auf Fließpapier getrockneten Masse in Äther. Der ätherische Auszug stellt nach Verdunsten des Lösungsmittels eine braune, weiche Masse vom Schmelzpunkt 39° dar.

Die Analyse ergab:
Neutralfett 94,2 %,
Unverseifbares 20,43 %,
wasserunlösliche Fettsäuren 53,65 %,
Gesamtsäurezahl 196,
Cholesteringehalt vor Verseifung 2,9 %,
„ nach „ 3,5 %,
Oxy- und Isocholesterin fehlen.

9. Subcutisfett.

An Stücken der normalen Fußsohle eines amputierten Unterschenkels wurde sorgfältig mit Hilfe des Rasiermessers und der krummen Schere das gesamte subcutane Fett abpräpariert. Die Fettgewebsmasse wurde dann mit Äther extrahiert und das Lösungsmittel zuerst an der Luft und zuletzt auf dem Wasserbade zum Verdunsten gebracht. Es resultiert ein bei Zimmertemperatur flüssiges, ölgelbes Fett.

Die Analyse ergab:
Unverseifbares 1 und 1,3 %,
Fettsäuren 84,3 und 85 %,
Gesamtsäurezahl 192 und 188,
Cholesteringehalt vor Verseifung 0,14 %,
„ nach „ 0,18 %,
Oxy- und Isocholesterin fehlen.

V. Bemerkungen zur folgenden Tabelle.

In der Rubrik Schmelzpunkt (1) fällt auf, daß unter den Sekretfetten das Talgdrüsenfett einen erheblich höheren Schmelzpunkt (53°) besitzt als die Knäueldrüsenfette (36,5 bis 46,5°).

Das Hauptinteresse konzentriert sich natürlich auf den wechselnden Cholesteringehalt der Hautfette, d. h. auf die ver-

gleichende Betrachtung der Rubriken 9, 11, 12 und 13, wobei wir bemerken, daß unter Cholesteringehalt hier kurz immer der Gehalt an Cholesterin und Cholesterinoxydaten zusammen verstanden wird.

Im allgemeinen weisen die Sekretfette einen viel geringeren Cholesteringehalt auf als die Zellenfette. Unter den ersteren verdient der Unterschied des Knäuelfettes der Fußsohle von dem der Handfläche hervorgehoben zu werden. Das erstere (Rubrik 11) hat viel mehr Cholesterin als letzteres (4,17: 1,43), außerdem aber noch — im Verhältnis zum Handflächenfett — so viel mehr freies Cholesterin (Rubrik 9) (2,55: 0,64), daß das Verhältnis von freiem Cholesterin zu dessen Estern sich in beiden Fetten gradezu umgekehrt verhält (Rubrik 13) (1,6: 1 im Gegensatz zu 0,8 : 1).

Die Zellenfette andrerseits besitzen einen sehr hohen Cholesteringehalt (Rubrik 11) (16,1 und 19,62). Bei diesen interessiert vor allem das Verhältnis des Cholesterins zu den hier zum ersten Male sicher chemisch nachgewiesenen Cholesterinestern. Dieses ist offenbar in den verschiedenen Schichten der Oberhaut (Stachelschicht, Hornschicht) ein verschiedenes. Wir haben als Grundlage einer solchen Vergleichung einerseits den Cholesteringehalt der gesamten Oberhaut (Stachelschicht + Hornschicht), andererseits den der Hornschicht allein. Wenn wir bedenken, daß das Fett der Hornschicht + Stachelschicht an freiem Cholesterin (Rubrik 9) 14%, das der Hornschicht allein, welche an Volumen die Stachelschicht bedeutend überwiegt, nur 10,71% beträgt, so geht daraus klar hervor, daß das Fett der Stachelschicht einen außerordentlich hohen Cholesteringehalt besitzen muß, jedenfalls weit mehr als 14%. Praktisch genommen können wir die Stachelschicht als den Hauptsitz des freien Cholesterins betrachten, und dieses auf makrochemischem Wege gewonnene Resultat stimmt in befriedigender Weise mit unserem mikrochemischen Nachweise des freien Cholesterins in der Oberhaut mittelst der Reaktion von Golodetz, wonach das freie Cholesterin sich hauptsächlich in den basalen Stachelzellen angehäuft vorfindet.

Betrachten wir demgegenüber das Vorkommen der Cholesterinester in beiden Schichten der Oberhaut, so zeigt sich ein geradezu umgekehrtes Verhalten, indem die Hornschicht an

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
		Schmelzpunkt	Konsistenz	Farbe	Das Fett enthält in Proz.			Gesamtsäurezahl	Cholesteringehalt vor Verseifung in Proz. (freies Cholesterin)		Cholesteringehalt nach Verseifung in Proz. (freies Cholesterin + Cholesterinester)		Cholesterin gebunden als Ester	Verhältnis zwischen freiem Cholesterin und Cholesterinester	Oxycholesterin	Isocholesterin
					Neutralfett	Unverseifbares	Fettsäuren		im Neutralfett	bezogen auf das Gesamtfett	im Unverseifbaren	bezogen auf das Gesamtfett				
Sekretfette	Comedonenfett	53°	talgig	gelblichweiß	—	30,5	44,9	202	—	—	9,16	**2,8**	—	—	sehr viel	0
	Fußschweißfett	36,5°	weich	braun	62,3	22,3	59,7	188	4,09	**2,55**	18,7	**4,17**	1,62	1,6:1	zieml. viel	0
	Handschweißfett	46,5°	wachsartig	braungelb	71,4	28,4	55,4	192	0,891	**0,64**	5,4	**1,43**	0,79	0,8:1	sehr wenig	0
Zellenfette	Oberhautfett	48–49°	wachsartig	bräunlich	88,4	32,2	54,75	181,5	15,88	**14,04**	50	**16,1**	2,06	7:1	0	0
	Hornschichtfett	51°	wachsartig	gelblich	83,7	36,35	52,21	172	12,8	**10,71**	54	**19,62**	8,91	1,2:1	0	0
	Nagelfett	38°	wachsartig	gelbbraun	—	41,64	50,2		—	—	43,75	**18,22**	—	—	zieml. viel	0
	Vernix caseosa	38–39°	weich	weiß	92,6	36	60	188	8,44	**7,82**	45	**16,2**	8,38	0,93:1	0	0
	Ohrenschmalz	39°	weich	braun	94,2	20,43	53,65	196	3,08	**2,9**	17,2	**3,5**	0,6	4,8:1	0	0
	Subcutisfett	flüssig	flüssig	ölgelb	80,7	1,15	84,65	190	0,173	**0,14**	15,8	**0,18**	0,04	3,5:1	0	0

Estern reicher ist als die Oberhaut im ganzen, mithin viel reicher als die Stachelschicht allein (Rubrik 13) (1,2 : 1 im Gegensatz zu 7 : 1). Auch aus dieser Betrachtung geht hervor, daß das Cholesterin der Stachelschicht fast reines, von Estern freies Cholesterin repräsentiert, während das Cholesterin der Hornschicht fast zur Hälfte als Ester und nur zur Hälfte frei vorhanden ist (Rubrik 13) (1 : 1,2).

Die Rubrik (14) Oxycholesterin ergibt das interessante Resultat, daß während der gewöhnlichen Verhornung der Zellen an der Hautoberfläche das in ihnen reichlich vorhandene Cholesterin sich nicht in Oxycholesterin umwandelt, während das Fett aller Hautsekrete mehr oder weniger Oxycholesterin aufweist, wohl wegen seines Kontaktes mit der Atmosphäre. Eine bisher isolierte Ausnahmestellung nimmt nur der Nagel ein, dessen Fett auch ziemlich viel Oxycholesterin enthält.

Die Vernix caseosa schließt sich eng der Hornschicht an, indem ihr Fett ebenso reich an Cholesterin ist (Rubrik 11) (16,2) und dasselbe Verhältnis von freiem Cholesterin zu Cholesterinestern besitzt (Rubrik 13) (0,93 : 1).

Das Ohrenschmalz hinwieder gleicht mehr den Sekreten in seinem Fettgehalt als den Oberhautzellen durch seinen relativ geringen Cholesteringehalt (Rubrik 11) (3,5) und Estergehalt (Rubrik 13) (4,8 : 1).

Das Subcutisfett gleicht wegen seiner großen Armut an Cholesterin (Rubrik 11) (0,18) von allen Fetten der Haut am meisten einem fast reinen, mit sehr wenig Cholesterin versetzten Glycerinfette.

VI. Ergebnisse.

1. Es gibt ein wohlcharakterisiertes Hautfett, welches den Knäueldrüsen entstammt.

2. Zwischen dem Knäuelfett und dem Hauttalge, dem Sekret der Talgdrüsen, bestehen erhebliche Verschiedenheiten. Der Talg hat einen höheren Schmelzpunkt und eine hellere Farbe, das Knäuelfett einen niedrigeren Schmelzpunkt, eine dunklere, bräunliche Farbe und einen eigenartigen Geruch.[1]) Diesen physikalischen Differenzen entsprechen quan-

[1]) Süßlich brenzlich. Wenn wir von einer näheren Charakterisierung der in der Tat verschiedenen Gerüche der Hautfette in dieser Arbeit

titative Verschiedenheiten in den Verhältnissen der chemischen Bestandteile.

3. Alle intra- und extracellulären Fette der Haut sind frei von Isocholesterin. Damit ist eine nähere Verwandtschaft des Hautfettes mit dem Lanolin (Wollfett) ausgeschlossen.

4. Es gibt unter den Bestandteilen der Hautfette Cholesterinester, deren Vorhandensein man früher irrtümlich auf Grund des positiven Ausfalls der Cholestol-Reaktion annahm, welche in dieser Arbeit aber zum ersten Male sicher qualitativ und quantitativ nachgewiesen wurden.

5. Unter den Hautfetten sind der chemischen Zusammensetzung nach Zellenfette und Sekretfette zu unterscheiden.

6. Unter den Zellenfetten zeichnet sich das Fett der Stachelschicht durch seinen Reichtum an Cholesterin und seine Armut an Cholesterinestern aus.

7. Das Fett der Hornschicht hingegen enthält ungefähr ebenso viel Cholesterin frei wie in Form von Estern gebunden. Mit der Verhornung geht also eine Bindung des Cholesterins und eine Bildung von Cholesterinestern einher.

8. In Sekretfetten findet umgekehrt ein Zerfall der Cholesterinester unter Freiwerden des Cholesterins statt. So enthält das Handknäuelfett relativ mehr Cholesterinester und weniger Cholesterin, das Fußknäuelfett mehr Cholesterin und weniger Cholesterinester.

9. Teils durch diesen Umstand, teils durch seine überaus hohen Säurezahlen (beispielsweise 137), teils endlich durch seinen höheren Gehalt an Oxycholesterin zeigt das Fußknäuelfett stets einen höheren Grad von sekundärer Veränderung (Zersetzung) als das Handknäuelfett.

10. Einen noch höheren Gehalt an Oxycholesterin als das Fußknäuelfett zeigt der Talg. Dieses für die Haare des Menschen bestimmte Fett läßt hierdurch eine gewisse

---

abgesehen haben, so geschah es wegen der Subjektivität, die allen Geruchsbezeichnungen anhaftet.

Neigung zur Oxydation des Cholesterins erkennen, wie sie in viel höherem Grade ausgeprägt beim Wollfett des Schafes vorkommt.

11. Im Gegensatz zu diesen Sekretfetten enthalten die Zellenfette der Oberhaut kein Oxycholesterin. Das Cholesterin des intracellulären Fettes unterliegt mithin nicht so leicht der Oxydation wie das des extracellulären, im Kontakt mit der Atmosphäre befindlichen. Eine isolierte Stellung in dieser Beziehung nimmt der Nagel ein, welcher ziemlich viel Oxycholesterin enthält.

Das biologische Verhalten jodierter Eiweißkörper.

Von

Hermann Freund.

(Aus dem Laboratorium der inneren Abteilung des städtischen Krankenhauses zu Wiesbaden.)

(Eingegangen am 12. Juli 1909.)

Die Fähigkeit der Eiweißkörper, bei parenteraler Einverleibung artspezifische Präcipitinbildung hervorzurufen, denken wir uns geknüpft an das Vorhandensein einer bestimmten, für jede Art konstanten Gruppierung im Eiweißmolekül. Die Präcipitine greifen an dieser Gruppe, die ihre Bildung auslöst, so an, wie andere Reagenzien an wohlcharakterisierten chemischen Gruppen des Eiweißmoleküls. Wie diese Gruppenreaktionen verschwinden, wenn ihr Angriffspunkt chemisch verändert wird — z. B. die Millonsche Reaktion nach Halogensubstitution in der Oxyphenylgruppe usw. —, so müßte auch eine chemische Änderung des artspezifischen Atomkomplexes demnach ihren Ausdruck finden in einer Abänderung der Immunitätsreaktion. Gelingt es also, mit physikalisch-chemischen Mitteln, deren Mechanismus wir kennen und über deren Angriffspunkt am Eiweißmolekül wir uns chemische Vorstellungen machen können, auch die biologische Reaktion des Eiweiß zu modifizieren, so haben wir damit einen Weg gefunden, um Einblick in die chemischen Grundlagen der Arteigenschaften der Eiweißkörper zu erhalten.

Das Verdienst, sich dieser Aufgabe — der Beeinflussung der Immunreaktion auf physikalisch-chemischem Wege — gewidmet zu haben, gebührt Obermayer und Pick. Ihre Versuche brachten zunächst den Beweis, daß in der Tat die präcipitinogene Funktion experimentell modifizierbar ist. Indem sie das Eiweiß durch Kochen, durch Einwirkung von Säure, von Alkali, von Formaldehyd, von Toluol, durch proteo-

lytische oder oxydative Spaltung in seinem physiko-chemischen Zustande abänderten, gelang es ihnen, auch das biologische Verhalten zu beeinflussen: allen diesen so mannigfachen Reaktionsprodukten kommt eine spezifische Präcipitinreaktion zu; sie sind durch ihre biologische Reaktion scharf voneinander und vom genuinen Eiweiß differenzierbar. Bei den obengenannten Veränderungen blieb aber die Artspezifität streng gewahrt: ein Immunserum, das durch Injektion eines dieser veränderten Eiweißkörper erzielt worden war, reagierte nur mit dem Produkte der gleichen Abstammung.

Obermayer und Pick kommen durch diese Ergebnisse zu der Annahme einer zweifachen Spezifizität: „Die eine hängt von der durch die Herkunft bedingten Zusammensetzung ab (originäre Gruppierung); die andere von der durch physikochemische Einflüsse bedingten Zustandsphase (konstitutive Gruppierung).“ In diesen ersten Versuchen war es ihnen also noch nicht geglückt, die „originäre Spezifizität“ anzugreifen; wohl aber war ihnen eine Beeinflussung der „Konstitutionsspezifizität“ gelungen. Diese experimentellen Änderungen der konstitutiven Gruppierung sind vielleicht analog den Vorgängen, die im lebenden Organismus stattfinden bei dem Aufbau der funktionell und physikalisch-chemisch so mannigfach gestalteten, hoch differenzierten Organeiweiße. Ihnen allen haftet das artspezifische Gepräge fest an, aber vermöge der Verschiedenheit ihrer Zustandsspezifizität sind sie durch die Präcipitinreaktion weitgehend voneinander zu unterscheiden. Es ist in einer Reihe von Fällen gelungen, Eiweißkörper der gleichen Tierart durch solche zustandspezifische Präcipitine zu differenzieren. (Casein von Lactalbumin, Eiklar von Dotter, Serumalbumin von Serumglobulin, Linseneiweiß von Glaskörper, Blutserum und Preßsaft von Leber, Nieren, Magen und Muskeln der gleichen Art.)

In einem einzigen Falle — soweit wenigstens bisher bekannt — ist aber der Organismus selbst noch weitergegangen: im Eiweiß der Linse ist, wie Uhlenhuth gezeigt hat, die „originäre Gruppierung“ nicht mehr nachweisbar; das Linseneiweiß bildet Präcipitine, die nicht mehr artspezifisch sind, sondern mit Linseneiweiß beliebiger Herkunft reagieren. Die Artspezifizität ist also verdrängt durch eine andere, die in der chemischen Struktur des Linseneiweißes begründet ist.

Zu ganz dem gleichen überraschenden Resultate sind Obermayer und Pick gekommen, als sie ihre Versuche mit jodierten, diazotierten und nitrierten Eiweißkörpern fortsetzten. Sie gewannen mit ihnen Präcipitine, die nicht mehr artspezifisch waren, sondern sich ganz so verhielten wie die Linseneiweißpräcipitine. Durch Jodierung, Diazotierung oder Nitrierung haben sie also ihr Ziel erreicht, die „originäre Gruppierung“ zu zerstören.

Über ihre Ergebnisse haben sie vor drei Jahren berichtet, leider ohne bisher Einzelheiten zu bringen.

Im Verlaufe von Versuchen, die wir im hiesigen Laboratorium anstellten und bei denen uns das biologische Verhalten jodierter

Eiweißkörper besonders interessierte, stellte sich die Notwendigkeit heraus, die Angaben Obermayers und Picks einer erneuten experimentellen Prüfung zu unterziehen. Über ihr Ergebnis soll in vorliegender Arbeit, die sich auf das Studium des biologischen Verhaltens des Jodeiweißes beschränkt, berichtet werden.

Zur Herstellung der Jodeiweißkörper wurden die Sera — bzw. Eieralbumin Merck in Sodalösung — mit Jodkalilösung und Natriumbicarbonat mehrere Stunden auf dem Wasserbade (40 bis 50 Grad) stehen gelassen (Blum-Hofmeister). Hierauf wurde mit verdünnter Essigsäure ausgefällt, und der Niederschlag zur Reinigung mehrmals in Soda gelöst und wieder gefällt, dann mit Alkohol so lange ausgewaschen, bis anorganisch gebundenes Jod durch salpetrige Säure nicht mehr nachweisbar war. Die so erhaltenen Präparate enthielten 6,5 bis 8 % Jod.

Große Schwierigkeiten machte es, die für die Versuche nötigen frischen Lösungen von bekannter Konzentration herzustellen, da die Jodeiweißkörper, wenn sie trocken aufbewahrt wurden, ihre Löslichkeit in halbprozentiger Sodalösung (höherer Alkaligehalt stört die Präcipitatbildung) verlieren. Die Präparate wurden daher in Wasser aufgeschwemmt und feucht aufbewahrt; um sie dann zur Wägung zu bringen, mußte vor jedem Versuche die erforderliche Menge durch Waschen mit Alkohol und Äther getrocknet werden. Nach dem Wägen wurde dann sofort eine 0,5 oder 1 %ige Lösung in 0,5 %iger Soda hergestellt.

Als Versuchstiere wurden Kaninchen verwandt, nachdem in einem Vorversuche sichergestellt war, daß normales Kaninchenserum mit Jodeiweiß weder Präcipitate bildet noch Komplement ablenkt. Eine Trübung der Resultate durch nicht spezifische Reaktionen war somit auszuschließen.

Zur Immunisierung wurden den Tieren einen um den andern Tag mehrere Injektionen von 0,5 bis 1,0 g gemacht, und zwar meist intraperitoneal, seltener intravenös. Die Jodeiweißimmuntiere bildeten nie vor der 5., zuweilen erst nach der 7. bis 9. Injektion Präcipitine. Die Blutentnahme zum Versuche erfolgte immer 5 Tage nach der letzten Injektion. Da sich die

Versuche über längere Zeit ausdehnten, mußten gelegentlich Tiere, die schon immun gewesen waren, aber ihre Immunität verloren hatten, nochmals verwandt werden; sie hatten gewöhnlich nach 1 bis 2 neuen Injektionen wieder reichlich Präcipitine.

Es wurde stets zunächst die Präcipitatbildung untersucht; die Resultate wurden teilweise durch die Komplementablenkungsmethode nachgeprüft. Für die Präcipitatreaktion wurde immer 1 ccm Immunserum mit absteigenden Mengen der präcipitablen Substanz im Volumen von 1 ccm zusammengegeben. Als hämolytisches System dienten: Hammelblutkörperchen in 5 %iger Aufschwemmung (1 ccm), Hammelkaninchenamboceptor 0,001 im Volumen 0,1 ccm und Meerschweinchenkomplement, das vor jedem Versuche austitriert wurde.

Die ersten Versuche bezweckten eine Prüfung der Jodpräparate. Zu diesem Zwecke wurden diese mit den Seris von Tieren zusammengebracht, die mit dem unjodierten Ausgangsmaterial — Eieralbumin Merck und Rinderserum — immunisiert worden waren.

Tabelle I.

Serum von Kaninchen A (3mal intravenös gespritzt mit Eieralbumin Merck).

Komplementablenkungsversuch.

Das Immunserum wurde mit Eiereiweiß und Jodeiereiweiß angesetzt.

Eiereiweiß-Immunserum A ccm	Eiereiweiß im Vol. 1,0	Hämolyse nach 2 Std.	Jodeiereiweiß im Vol. 1,0	Hämolyse nach 2 Std.
0,25	0,001	Spürchen	0,001	komplett
0,25	0,0005	0	0,0005	„
0,25	0,00025	0		„
0,25	0,00012	0		„
0,25	0,00006	0		„
0,25	0,00003	0		„
0,25	0,000015	0		„
0,25	0,000075	Spur		„
0,25	0,0000037	komplett	0,0000037	„

Kontrolle des Systems: Komplette Lösung nach 1/4 Stunde.

Tabelle II.

Serum von Kaninchen B (4 mal mit Rinderserum gespritzt), zusammengebracht mit Rinderserum und Jodrindereiweiß. (Um Vergleichszahlen zu erhalten, wurde das Serum als 10 %ige Eiweißlösung angenommen.)

Immunserum B ccm	Rindereiweiß	Präcipitat nach $^3/_4$ Std.	Präcipitat nach 3 Std.	Präcipitat nach 24 Std.	Jodrindereiweiß	Präcipitat nach $^3/_4$, 3, u. 24 Std.
1	0,0025	trüb	++	++	0,0025	0
1	0,00125	++	+++	+++	|	0
1	0,00062	++	+++	+++	|	0
1	0,00031	+	++	+++	|	0
1	0,00016	st. Tr.	+	++	|	0
1	0,00008	trüb	+	+	|	0
1	0,00004	?	+	+	0,00004	0

In diesen Versuchen zeigen also Immunsera, die mit den genuinen Eiweißkörpern stark reagieren, auch nicht die Spur einer Reaktion mit den jodierten Präparaten. Nach der Jodierung war also unverändertes Eiweiß durch die Präcipitinreaktion nicht mehr nachweisbar. Zu dem gleichen Ergebnis führte ferner folgender Versuch:

Es wurden Meerschweinchen überempfindlich gemacht. Um den Zustand der Überempfindlichkeit mit größerer Sicherheit erzielen zu können, wurde hierzu die Versuchsanordnung gewählt, die unter dem Namen des „Theobald Smithschen Phänomens“ bekannt ist. Sie basiert auf der Erfahrung, daß Meerschweinchen, die einmal zur Austitrierung von Diphtherieheilserum verwandt worden sind, also Tiere, denen ein Gemenge von Diphtherietoxin und antitoxinhaltigem Pferdeserum eingespritzt worden ist — bei einer zweiten Injektion von Pferdeserum die Erscheinungen des „anaphylactischen Shocs“ zeigen, dem sie in den meisten Fällen erliegen. Der anaphylactische Zustand ist zwar auch durch Injektion von Serum allein erzielbar, doch scheint das gleichzeitige Vorhandensein des Toxin-Antitoxingemenges sein Zustandekommen zu fördern. Da die Auslösung der Überempfindlichkeitsreaktion streng spezifisch ist, d. h. nur bei Einspritzung des gleichen Antigens eintritt, so wäre in unserem Falle, wenn zur zweiten Einspritzung jodiertes Pferdeserum verwandt wird, ihr Ausbleiben beweisend für die Veränderung der antigenen Gruppe des Pferdeserums durch die Jodierung.

Einigen Meerschweinchen von ca. 400 g wurde Diphtherietoxin (für dessen Überlassung wir den Höchster Farbwerken zu großem Danke verpflichtet sind) mit einem Überschuß von Antitoxin in 0,5 ccm Heilserum (Höchst) intraperitoneal eingespritzt. Da nach 12 Tagen ein Tier, dem probeweise Pferdeserum injiziert wurde, nur leichte Überempfindlichkeitserscheinungen (vorübergehende Lähmung der unteren Extremitäten) zeigte, wurde der Versuch bis zum 20. Tage nach der Vorbehandlung verschoben: Ein Tier erhielt 0,25 ccm Serum subcutan; bald nach der Injektion traten bei dem Tiere Erscheinungen von Unbehagen auf, die sich allmählich verstärkten; nach 1 Stunde deutliches, nach 2 Stunden sehr starkes Ödem der Injektionsstelle (Artussches Phänomen); zugleich trat Zucken der Ohr- und Gesichtsmuskulatur und rhythmische krampfartige Kontraktionen der Rumpfmuskulatur auf, sowie anhaltende Kaubewegungen und Kratzen an der Nase; zunehmender Schwächezustand; etwa 6 Stunden nach der Injektion erfolgte ein Partus prämaturus zweier toter Jungen und der Exitus des Tieres. — Da durch diesen Versuch das Bestehen des anaphylactischen Zustandes gesichert schien, erhielten die anderen Tiere Einspritzungen mit jodiertem Pferdeeiweiß: bei diesen Tieren fehlten alle Überempfindlichkeitserscheinungen.

Mit diesen beiden Versuchen ist somit der Beweis geführt, daß bei der Jodierung in der Tat die artspezifische antigene Gruppe abgeändert sein muß. Hiernach ergaben sich folgende Fragen:

1. Wirken die Jodeiweißkörper antigen?

2. Sind durch sie entstandene Immunsera noch artspezifisch — vielleicht mit veränderter Reaktionsbreite, so daß also nur die konstitutive Spezifizität verändert ist — oder ist in der Tat die originäre Gruppierung der Eiweißkörper bei der Jodierung völlig verloren gegangen?

Der Versuch der Immunisierung wurde mit Jodrindereiweiß und Jodeiereiweiß gemacht. Das Kaninchen C war nach 5 Einspritzungen von Jodrindereiweiß noch nicht immun; erst nach der 6. Einspritzung (jedesmal 0,5 bis 1,0 g) waren Präcipitine nachweisbar. Das Kaninchen D hatte erst nach 7 Injektionen von Jodeiereiweiß Präcipitine gebildet.

Die beiden Immunsera von Kaninchen C und D wurden nunmehr mit Jodeiweißkörpern verschiedener Abstammung zusammengebracht. Dabei zeigte sich, daß in der Tat die Herkunft der Präparate keine Unterschiede machte. Es tritt bei der Jodierung an die Stelle der verdrängten Artspezifizität eine neue: die Jodspezifizität. Diese tritt sogar so stark in Erscheinung, daß Kaninchen mit jodiertem Kanincheneiweiß präci-

pitieren, und zwar ebenso stark wie mit Jodeiweiß anderer Abstammung.

Tabelle III.

Serum von Kaninchen C mit Jodrindereiweiß;
Serum von Kaninchen D mit Jodeierweiß.
Präcipitatbildung.

Jodrinder-eiweiß-Immun-serum C ccm	Jod-rinder-eiweiß	Präcipitat nach 3 Std.	Jod-eiereiweiß-Immun-serum D	Jod-eiereiweiß	Präcipitat nach 2 Std.	Präcipitat nach 21 Std.
1	0,0025	+++	1	0,0025	trüb	+
1	0,0012	+++	1	0,0012	+	++
1	0,0006	+++	1	0,0006	++	+++
1	0,0003	++	1	0,0003	+++	+++
1	0,00015	++	1	0,00015	+	++
1	0,00007	+	1	0,00007	trüb	+
1	0,000035	0	1	0,000035	0	trüb
1	0,000017	0				

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß das jodierte Eiweiß Antikörperbildung auslöst, allerdings ist eine größere Zahl von Injektionen erforderlich als beim ursprünglichen Eiweiß.

Tabelle IVa.

Jodrindereiweiß-Immunserum von Kaninchen C mit Jodeiereiweiß, Jodpferdeeiweiß und Jodkanincheneiweiß.

Immun-serum C ccm	Jod-eier-eiweiß	Präci-pitat nach 16 Std.	Jod-pferde-eiweiß	Präcipitat nach 3 Std.	Jod-kaninch.-eiweiß	Präcipitat nach 3 Std.
1	0,0025	++	0,0025	+++	0,0025	+++
1	0,0012	+++	0,0012	+++	0,0012	+++
1	0,0006	+++	0,0006	+++	0,0006	+++
1	0,0003	++	0,0003	trüb	0,0003	++
1	0,00015	+	0,00015	schw. Trübg.	0,00015	trüb
1			0,00007	0	0,00007	schw. Trübg.
1			0,000035	0	0,000035	0
1			0,000017	0	0,000017	0

Tabelle IVb.

Jodeiereiweiß-Immunserum von Kaninchen D mit Jodrindereiweiß und Jodkanincheneiweiß.

Immunserum D ccm	Jodrindereiweiß	Präcipitat nach 2 Std.	Präcipitat nach 21 Std.	Jodkaninch.-eiweiß	Präcipitat nach 2 Std.	Präcipitat nach 21 Std.
1	0,0025	trüb	++	0,0025	trüb	++
1	0,0012	+	+	0,0012	++	++
1	0,0006	++	++	0,0006	+	+++
1	0,0003	trüb	+	0,0003	st. trüb	++
1	0,00015	trüb	+	0,00015	trüb	+
1	0,00007	0	trüb	0,00007	trüb	+
1	0,000035	0	0	0,000035	0	0

Auffallend war der Unterschied, den die beiden Immunsera C und D in der Reaktion mit dem Arteiweiß zeigten, durch dessen Jodderivat sie gewonnen waren: während nämlich, wie zu erwarten war, das Jodeiereiweiß-Immunserum mit Eiereiweiß kein Präcipitat gab, präcipitierte das Jodrindereiweiß-Immunserum stark mit Rinderserum:

Tabelle V.

Jodrinder-Immunserum C mit Rindereiweiß,
Jodeier-Immunserum D mit Eiereiweiß.

Immunserum C ccm	Rindereiweiß	Präcipitat nach 16 Std.	Immunserum D ccm	Eiereiweiß	Präcipität nach 2 Std.	Präcipität nach 21 Std.
1	0,0025	+	1	0,0025	0	0
1	0,0012	++	1	0,0012	0	0
1	0,0006	+	1	0,0006	0	0
1	0,0003	++	1	0,0003	0	0
1	0,00015	trüb	1	0,00015	0	0
			1	0,00007	0	0

Das Jodeiereiweiß hatte demnach die Bildung artspezifischer Präcipitine nicht mehr ausgelöst, und es waren nur jodspezifische Antikörper entstanden. Das Jodrindereiweiß aber hatte neben der jodspezifischen auch artspezifische Präcipitinbildung hervorzurufen vermocht, obwohl das Präparat nicht mit einem Immunserum präcipitiert hatte, das gegen genuines Rinderserum gebildet war.

Ehe ich auf eine Erklärung dieses merkwürdigen Verhaltens eingehe, möchte ich zunächst über einen Versuch berichten, der zeitlich den bisherigen voranging, und der dadurch,

daß er den Ergebnissen Obermayers und Picks völlig widersprach, die Veranlassung zu der vorliegenden Arbeit wurde.

Mit Jodeiereiweiß — das, wie hervorzuheben ist, ebenfalls mit Eiereiweiß-Immunserum nicht präcipitiert hatte, — war Kaninchen E immunisiert worden (7 Injektionen) und zwar mit folgendem Resultat:

Tabelle VIa.

Präcipitatbildung.

Serum E ccm	Jodeiereiweiß	Präcipitat nach 2 Std.	Präcipitat nach 24 Std.	Eiereiweiß	Präcipität nach 2 Std.	Präcipität nach 24 Std.	Jodpferdeeiweiß	Präcipitat nach 2 Std.	Präcipitat nach 24Std
1	0,0025	trüb	0	0,003	trüb	++	0,0025	0	0
1	0,0012	+++	+++	0,0015	trüb	++	0,0012	0	0
1	0,0006	+++	+++	0,0007	Spur	++	0,0006	0	0
1	0,0003	+++	+++	0,00035	0	+	0,0003	0	0
1	0,00015	+++	+++	0,00017	0	trüb	0,00015	0	0
1				0,00008	0	schw. tr.	0,00007	0	0

Tabelle VIb.

Komplementablenkungsversuch.

Kontrolle des hämolytischen Systems: nach 1/4 Stunde komplette Lösung.

Serum E ccm	Jodeiereiweiß	Hämolyse nach 2 Std.	Eiereiweiß	Hämolyse nach 2 Std.	Jodpferdeeiweiß	Hämolyse nach 1 Std.
0,25	0,0005	0	0,0005	0	0,0005	komplett
0,25	0,00025	0	0,00025	0	0,00025	„
0,25	0,00012	0	0,00012	0	0,00012	„
0.25	0,00006	0	0,00006	0	0,00006	„
0,25	0,00003	0	0,00003	0	0,00003	„
0,25	0,000015	0	0,000015	0	0,000015	„
0,25	0,000008	0	0,000008	stark	0,000008	„
0,25	0,000004	Spur	0.000004	komplett	0,000004	„
0,25	0,000002	komplett	0,000002	komplett		

Dieses Kaninchen E hatte also gegen die jodspezifische Gruppierung Antikörper nicht gebildet; es war bei der Immunisierung mit Jodeiereiweiß ein gegen Eiereiweiß artspezifisches Immunserum entstanden, das sich von durch Eiereiweiß ausgelöstem Immunserum nur in der Reaktionsbreite — durch seine Fähigkeit neben Eiereiweiß auch mit Jodeiereiweiß zu präcipitieren — unterschied.

Das Fehlen jodspezifischer Präcipitine bei diesem Tiere findet seinen Grund wohl in seiner individuellen Eigenart, nämlich in dem Unvermögen, gegen die jodspezifische Gruppe

Antikörper zu bilden. Mit solchen individuellen Schwankungen haben ja alle biologischen Reaktionen zu rechnen.

Wie aber konnten hier und in dem Falle des Jodrinderimmuntieres überhaupt artspezifische Präcipitine entstehen, obwohl die als Antigen verwandten Jodeiweißkörper kein Präcipitat mit solchen Immunseris bildeten, die durch Injektion der Ausgangseiweißkörper gewonnen waren? Mir scheinen hier zwei Deutungen möglich:

Einmal ist es denkbar, daß bei der Jodierung diejenige Komponente des artspezifischen Komplexes zerstört wurde, welche die Ausfällung bedingt, also die „ergophore“ Gruppe, während die „haptophore“ Gruppe, die als solche präcipitinogen wirkt, erhalten geblieben wäre. Wäre dies der Fall, so müßte also das Jodeiweiß imstande sein, neben jodspezifischen auch artspezifische Antikörper zu erzeugen, aber die Fähigkeit verloren haben, mit artspezifischen Präcipitinen Niederschläge zu bilden. Gegen diese Deutung spricht aber der Fall des erstgenannten Jodeierimmuntieres D, dessen Serum mit Eiereiweiß nicht präcipitierte.

Eine andere Auffassung gibt wohl eine befriedigendere Erklärung der gefundenen Tatsachen. Sie geht aus von der Annahme, daß die artspezifische Gruppe des Eiweißmoleküls eine Vielheit von Receptoren besitzt, die bei der Jodierung zum großen Teil, aber nicht in ihrer Gesamtheit außer Wirkung gesetzt werden. Dieser intakte Rest artspezifischer Receptoren reicht nun, — unter der wohl zutreffenden Voraussetzung großer individueller Verschiedenheiten, — bei der Mehrzahl der Versuchstiere nicht aus, um artspezifische Präcipitine zu erzeugen; ebenso wenig vermögen die meisten artspezifischen Immunsera mittels dieses Restes von Receptoren Präcipitate mit Jodeiweißkörpern zu bilden. Wohl aber ist es denkbar, daß manche Tiere gerade für diesen Rest von artspezifischen Rezeptoren besonders empfindlich sind, und so noch artspezifische Präcipitine gegen sie zu bilden vermögen, während die Mehrzahl der Individuen dessen nicht mehr fähig ist.

Um zu prüfen, wie weit die jodspezifische Gruppierung selbständig Antikörper auszulösen vermag, wurden noch folgende beiden Versuche gemacht:

Es war daran zu denken, daß es gelingen könnte, Kanin-

chen gegen jodiertes Kanincheneiweiß zu immunisieren. Aus den nicht ins Einzelne gehenden Veröffentlichungen von Obermayer und Pick geht nicht hervor, ob ihnen dies mit dem Jodeiweiß gelungen ist. Mit dem Kaninchenxanthoprotein scheinen sie beim Kaninchen selbst Präcipitine erzielt zu haben. Dieses Experimentum crucis ist mir bei einem Kaninchen F nicht geglückt; nach 7 Injektionen von Jodkanincheneiweiß hatte dieses Tier jodspezifische Präcipitine nicht gebildet.

Dafür gelang ein anderer Immunisierungsversuch:

Kaninchen G wurde mit Jodeiweißkörpern verschiedener Herkunft gespritzt, und zwar erhielt es von jedem einzelnen Jodeiweiß eine geringere Zahl von Injektionen (höchstens 3), als bei dessen alleiniger Verwendung zur Jodpräcipitinbildung erforderlich gewesen wär. Das Tier wurde folgendermaßen vorbehandelt:

am 23. II. 09 Injektion von Jodkanincheneiweiß,
„ 25. II. 09 „ „ Jodpferdeeiweiß,
„ 27. II. 09 „ „ Jodeiereiweiß,
„ 2. III. 09 „ „ Jodrindereiweiß,
„ 4. III. 09 „ „ Jodeiereiweiß,
„ 6. III. 09 „ „ Jodrindereiweiß.

Da am 12. III. 09 Präcipitine kaum nachweisbar waren, wurde die Immunisierung fortgesetzt:

am 13. III. 09 Injektion von Jodeiereiweiß,
„ 19. III. 09 „ „ Jodkanincheneiweiß,
„ 23. III. 09 „ „ Jodrindereiweiß.

Am 29. III. wurde der Versuch wiederholt,

Tabelle VII.

Immunserum G ccm	Jodeiereiweiß	Präcipitat nach 3 Std.	Jodrindereiweiß	Präcipitat nach 3 Std.
1	0,005	0	0,005	trüb
1	0,0025	trüb	0,0025	stark trüb
1	0,0012	+	0,0012	+
1	0,0006	++	0,0006	++
1	0,0003	++	0,0003	++
1	0,00015	+	0,00015	+

Aus diesem Versuche geht demnach mit Sicherheit hervor, daß die jodspezifische Jodierung selbständig ohne Rücksicht auf die Art des Ausgangseiweißes als Antigen zu wirken vermag.

Hervorzuheben ist, daß die Jodeiweißimmuntiere sich von mit genuinem Eiweiß vorbehandelten Tieren in mancherlei Punkten unterscheiden.

Bei keinem der Tiere trat eine Überempfindlichkeit gegen erneute Jodeiweißeinspritzung ein; so hat z. B. Kaninchen C im Verlauf von 5 Monaten 14 Injektionen von Jodrindereiweiß erhalten und während dieser Zeit an Körpergewicht von 2420 g auf 3200 g zugenommen. Sehr auffallend war ferner, daß die Sera der Kaninchen C und D, nachdem sie mehrmals immun gewesen waren und ihre Immunität wieder verloren hatten, schließlich trotz mehrfacher erneuter Einspritzungen keine Präzipitatbildung mehr zeigten.

Auf die Amboceptorhämolyse wirkt ein 1 ccm Jodimmunserum komplett hemmend; leider fehlen mir hier die Vergleichszahlen von normalen Kaninchen und von mit genuinem Eiweiß behandelten Tieren; doch scheint das Hemmungsvermögen solcher Sera erheblich geringer zu sein.

Das Ergebnis der obigen Versuche läßt sich im Folgenden zusammenfassen:

Bei der Jodierung wird den Eiweißkörpern die Fähigkeit genommen, mit artspezifischen Immunseris zu präcipitieren. Ein weiterer Beweis für die Abänderung der artspezifischen antigenen Gruppe ist die Tatsache, daß es nicht gelingt, bei Tieren, die gegen ein genuines Eiweiß überempfindlich sind, durch Jodeiweiß den anaphylaktischen Shoc auszulösen. Die Antikörper, welche durch Jodeiweißinjektionen erzielt werden, reagieren mit Jodeiweiß ohne Unterschied der Abstammung, sogar mit jodiertem arteigenem Eiweiß.

Wir sehen also, daß die biologischen Reaktionen des artspezifischen Atomkomplexes verändert sind. Gelingt es nun, von den chemischen Umwandlungen, die diesen biologischen Veränderungen zugrunde liegen, ein Bild zu gewinnen?

Nach Hofmeister geht bei der Jodierung ein Molekül Eiweiß in ein Molekül Jodeiweiß über. Der Eintritt des Jods geht mit größter Wahrscheinlichkeit ohne Abspaltung von Stickstoff vor sich, wie aus den Analysenzahlen hervorgeht; dagegen wird ein stickstofffreier, kohlenstoffhaltiger Komplex abgespalten. Das Jod wirkt substituierend an den aromatischen Kernen, während die aliphatischen Seitenketten wohl ganz frei bleiben. Aus dem Fehlen der Millonschen Reaktion folgt, daß die Hydroxylgruppe am Benzolkern durch Jod verdrängt worden ist. Von den zu erwartenden oxydativen Vorgängen ist nur

die Oxydation des Schwefels sichergestellt. Die Reaktion der Eiweißlösung wird sauer, was zum Teil durch Entstehung von Säuregruppen infolge der Oxydationsvorgänge erklärlich ist, zum Teil aber wohl darauf zurückzuführen ist, daß durch den Jodeintritt die elektronegativen Eigenschaften der Benzolverbindungen gesteigert werden.

Man wird als sicher annehmen dürfen, wie dies auch Obermayer und Pick tun, daß der artspezifische Atomkomplex an die aromatischen Kerne des Eiweißmoleküls gebunden ist. Darauf weist ja auch die gleichgerichtete Beeinflussung des biologischen Verhaltens durch die Nitrierung und Diazotierung hin.

Näheres über die chemische Struktur der artspezifischen Gruppe auszusagen, ist aus den bisherigen Versuchen noch nicht möglich; aber es steht zu hoffen, daß der Weg, den Obermayer und Pick gewiesen haben, dahin führen wird, dem Probleme der Artzpezifizität näher zu kommen.

Literatur.

Ascoli, Münch. med. Wochenschr. 1902.
Blum, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28.
Coca, diese Zeitschr. 1908, Heft 1.
von Dungern und Coca, Berl. klin. Wochenschr. 1907.
von Dungern, Festschrift für Robert Koch 1903.
Eisenberg, Centralbl. f. Bakt. 31, 1902.
Grund, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 87, 1906.
Hamburger, Arteigenheit und Assimilation Wien, 1903.
Hamburger, Deutsche med. Wochenschr. 1905.
Hofmeister, Zeitschr. f. physiol. Chem. 24.
Kraus, Referat auf dem 23. Kongreß f. inn. Med. in München 1906.
Levaditi in Weichardts Jahresbericht der Immunitätsfoschung 1908.
Michaelis, Deutsche med. Wochenschr. 1902 u. 1904.
Michaelis, Zeitschr. f. klin. Med, 56
Obermayer und Pick, Wiener klin. Rundschau 1902.
Obermayer und Pick, Wiener klin. Wochenschr. 1903, 1904, 1906.
Pick und Pribram, diese Zeitschr. 1908, Heft 11.
von Pirquet, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. 1, 1907.
Schloßmann und Moro, Münch. med. Wochenschr. 1903.
W. A. Schmidt, diese Zeitschr. 1908, Heft 4.
Uhlenhuth, Festschrift f. Robert Koch 1904.
Uhlenhuth, Beiheft d. med. Klin. 1907, Heft 9.

Zur Kenntnis der Zuckerspaltungen.

V. (vorläufige) Mitteilung.

Die Umkehrung der Zuckersynthese.

Von

Walther Löb.

(Aus der chemischen Abteilung des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 14. Juli 1909.)

Da die Bearbeitung des experimentellen Materials und der theoretischen Gesichtspunkte, die sich aus ihm ergeben, noch einige Zeit beanspruchen wird, so möchte ich in dieser Mitteilung nur einige Resultate voranschicken, die mir von allgemeinerem chemischen und biologischen Interesse zu sein scheinen.

Durch die Versuche über den Zuckeraufbau aus Kohlensäure und Wasser unter dem Einfluß der stillen Entladung und über die Elektrolyse des Traubenzuckers, des Glykols und Glycerins hat die v. Baeyersche Annahme von der Rolle des Formaldehyds neue experimentelle Stützen gefunden. Gleichzeitig führten mich diese Versuche zu der Anschauung, daß auch bei dem Zuckerabbau, wie er in der physiologischen Verbrennung und den Gärungsvorgängen zutage tritt, der Formaldehyd eine besondere Rolle spielt, entweder als Zwischenphase der Oxydation zu Kohlensäure oder als Ausgangspunkt neuer Synthesen. Besonders die merkwürdige Beobachtung, daß bei der Elektrolyse des Glycerins in saurer Lösung eine Pentose entsteht, zeigt, wie leicht und unter welchen Bedingungen der Formaldehyd zu synthetischen Reaktionen befähigt ist. Wenn ich hierbei von Formaldehyd spreche, so muß ich besonders betonen, daß nicht der Formaldehyd selbst, sondern eine tautomere aktive Form desselben, die etwa, welche in alkalischer

Lösung, mit freien Valenzen begabt, gerade zur Zuckersynthese befähigt ist, der eigentliche Reaktionsträger zu sein scheint. Macht man die Hypothese, daß der Formaldehyd in einer labilen Zwischenform auftreten kann — und diese Hypothese scheint mir aus vielen Tatsachen mit Notwendigkeit hervorzugehen — so muß man annehmen, daß zwei typische Reaktionen dieses labile Produkt zu verändern vermögen. Erstens die synthetischen, die ihn in Kohlenhydrate oder andere Substanzen verwandeln, zweitens die umlagernden, welche aus der labilen Form den beständigen Formaldehyd schaffen. Sind die Bedingungen zur Synthese ungünstig oder nicht vorhanden, so kann die zweite Reaktion in nachweisbarem Umfange vor sich gehen.

Betrachten wir unter diesem Gesichtspunkte die Synthese einer Hexose aus Formaldehyd in Gegenwart von Hydroxylionen, eine Reaktion, welche ich, wie aus der Rolle, die ich dem Formaldehyd beim Aufbau und Abbau zuschreibe, als eine umkehrbare ansehe, so lassen sich die Verhältnisse auch in folgender Weise ausdrücken. Wie die Existenz der verschiedenen Zucker der 4-, 5-, 6- usw. Reihe in der Natur zeigt, kann der Aufbau zum Zucker ein allmählicher sein, d. h. es kann also eine Phase der Reaktion z. B. zwischen Pentose und Formaldehyd auftreten. Im Anschluß an die angestellten Versuche soll gerade die Phase der Reaktion:

$$C_5H_{10}O_5 + CH_2O = C_6H_{12}O_6$$

besprochen werden. Bei der Umkehrbarkeit der Reaktion muß, wenn sie in dieser Weise eintritt, ein Gleichgewichtszustand existieren, d. h. bei dem Zucker*abbau* kann die Reaktion:

$$C_6H_{12}O_6 = CH_2O + C_5H_{10}O_5$$

von Bedeutung sein. Dieser Gleichgewichtszustand ist weder wenn man von Traubenzucker, noch wenn man von Formaldehyd ausgeht, ohne weiteres nachweisbar. Er liegt so zugunsten der Hexose, daß in neutralen Lösungen von Zucker kein Formaldehyd und keine Pentose vorhanden und ebenso bei Bedingungen, die eine Zuckersynthese aus Formaldehyd gestatten, der Formaldehyd vollständig verschwunden zu sein scheint. Wohl aber kann man eine Anreicherung der rechtsstehenden Substanzen der letzten Gleichung erzwingen, wenn man Bedingungen herstellt, die einerseits die Traubenzucker-

konzentration verringern, andererseits für den synthetischen Vorgang nicht besonders geeignet sind, so daß die Umwandlung der zuerst in labiler Form, als Dissoziationsprodukte entstehenden Substanzen CH_2O und $C_5H_{10}O_5$ in die beständigen Formaldehyd- und Pentosenmoleküle möglich ist.

Diese Verhältnisse lassen sich nun leicht darstellen. Nachdem ich gefunden hatte, daß selbst so geringe Hydroxylionenkonzentrationen, wie sie Zinkcarbonat in Wasser liefert, die reichliche Zerstörung von Traubenzucker veranlassen, ohne der Synthese des Formaldehyds besonders günstig zu sein, nahm ich Versuche auf, die speziell der Frage dienen sollten, ob durch derartige Reagenzien unter milden Bedingungen, d. h. bei niedriger Temperatur eine Spaltung des Traubenzuckers in Pentose und Formaldehyd nachweisbar ist. Selbstverständlich drängt sich sofort die Frage auf, ob nicht die Pentose gleichfalls weiter dissoziiert wird, etwa in eine Tetrose und Formaldehyd. Jedoch blieb diese Frage zunächst experimentell im Hintergrunde, da bei dem großen, stets vorhandenen Überschuß von Traubenzucker, der bei Unterbrechung der Versuche noch immer das Hauptmaterial des Angriffs seitens des Mediums bot, eine weitere Zersetzung der Pentose nur dann zu erwarten war, wenn sie leichter angreifbar ist als Traubenzucker. Aber das Gegenteil dieser Forderung war unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen der Fall, wobei hinzukommt, daß eben die minimale Konzentration, in der die Pentose auftritt, jede Reaktion, die sie erleidet, äußerst verlangsamt, während umgekehrt die hohe Konzentration des Traubenzuckers jede diesem mögliche Reaktion beschleunigt.

Durch das Zusammentreffen dieser Umstände war es mir möglich, die Spaltung des Traubenzuckers in Pentose und Formaldehyd in folgenden Systemen nachzuweisen.

1. Bei der Umkehrung der Zuckersynthese aus Formaldehyd mittels Bleihydroxyd bei 70° nach der Vorschrift von Lobry du Bruyn und van Eckenstein[1]). Läßt man bei dieser Temperatur eine 4%ige Lösung von Traubenzucker mit 0,8% frisch gefälltem und gründlich ausgewaschenem Bleihydroxyd stehen, so bildet sich außer den Polyoxysäuren und Ameisen-

---

[1]) vgl. Lippmann, Chemie der Zuckerarten 1904.

säure Pentose und Formaldehyd. In diesem Falle, wie auch in den folgenden, steht die Bildung dieser Säuren, neben denen wahrscheinlich auch Polyoxyalkohole entstehen, insofern mit der Erzeugung von Pentose und Formaldehyd in Zusammenhang, als die durch sie bewirkte Abnahme der Traubenzuckerkonzentration das Gleichgewicht zwischen diesem und seinen Spaltprodukten stört. Das Gleichgewicht kann sich auf zweierlei Weise wiederherstellen; einmal durch Traubenzuckerrückbildung, dann durch Umlagerung in die beständigen Pentose- und Formaldehydmoleküle. Man muß annehmen, daß unter den gewählten Verhältnissen die Synthese so langsam, die Umlagerung so schnell verläuft, daß jedenfalls ein Teil der $C_5H_{10}O_5$- und CH_2O-Reste Zeit für die letztere findet.

2. Bei der Einwirkung von Natronlauge verschiedener Konzentration bei gewöhnlicher Temperatur und bei Bruttemperatur mit und ohne Wasserstoffperoxyd, mit und ohne Sauerstoffdurchlüftung auf Traubenzucker. Die Reaktionen, welche die Pentosen- und Formaldehydbildung begleiten, sind in diesen Fällen komplizierter als in dem erst geschilderten. Die Gegenwart des Bleihydroxyds veranlaßt die Ausscheidung schwer löslicher Bleisalze einiger Säuren, wie der Zuckersäure und der Ameisensäure, wodurch diese Produkte vor dem weiteren Angriff großenteils geschützt werden. Bei Anwendung der Natronlauge findet diese Hemmung nicht statt. Ein wesentlicher Unterschied gegenüber den Bleihydroxydversuchen bildet die Entstehung der schon oft bei dieser Reaktion beobachteten Milchsäure. Zu erwähnen ist noch, daß sowohl bei den Bleihydroxyd- wie bei den Natronlaugeversuchen die vor einiger Zeit bei anderen Zuckerspaltungen von mir beobachteten Osazone des Acetols und Dimethylketols, zweier Jodoform liefernder Substanzen, regelmäßig, wenn auch in geringer Menge gewonnen wurden.

Besonderes Interesse besitzt die Frage, wie sich bei Bruttemperatur Traubenzucker in alkalischer Lösung verhält, deren Alkalescenz derjenigen des Blutes entspricht. Versuche in 0,3%iger Natronlauge zeigten, daß auch hier die typische Spaltung in Formaldehyd und Pentose eintritt, gleichzeitig mit den andern Zuckerabbaureaktionen, wie Bildung von Ameisensäure und Polyoxysäuren. Eine „Glykolyse“ findet also lediglich durch die Alkalescenz des Blutes statt, und es bedarf

keinerlei Enzyme, um die Abnahme des Zuckergehaltes im Blute zu verstehen.

Es ist klar, daß bei der vollständigen Verbrennung des Zuckers, wie sie im Organismus stattfindet, diejenige Reaktion am stärksten beschleunigt ist, welche über die unbeständigsten Zwischenphasen zur Kohlensäure führt. Das ist die Spaltung des Zuckers unter Lösung der Aldolbindungen. Hierbei bildet sich einerseits die der Verbrennung leicht zugängliche, als solche nur in minimalsten Konzentrationen auftretende CH_2O-Verbindung, zunächst neben $C_5H_{10}O_5$. Die Annahme, daß bei schnell verlaufender Oxydation diese Spaltung dauernd allen anderen Reaktionen gegenüber, die der künstliche Versuch zeigt, vorherrschend wird, bietet ebensowenig Schwierigkeiten wie die, daß unter solchen Verhältnissen die $C_5H_{10}O_5$-Reste einer weiteren sukzessiven Aufspaltung unterliegen. Daß daneben stets die in alkalischer Lösung möglichen synthetischen Vorgänge ablaufen, die aus $C_5H_{10}O_5 + CH_2O$ einerseits zum Traubenzucker zurück, andererseits zu Fructose usw. führen können, daß vorübergehend wenigstens auch spurenweise Polyoxysäuren auftreten können, ist möglich und innerhalb der Grenzen, welche die uns unbekannten Verhältnisse der Reaktionsgeschwindigkeit gestatten, sicher. Sie können aber für das biologische Problem zunächst außer acht gelassen werden. Man weiß nun aus der Untersuchung diabetischer Patienten, daß, obgleich der Zucker den Organismus unverbrannt verläßt, sein Oxydationsvermögen nicht herabgesetzt ist. Es drängt sich daher die Annahme auf, daß in normalem Zustande die Zuckerdissoziation, welche die Oxydationsfähigkeit schafft, sehr günstige, in jenen pathologischen Zuständen sehr ungünstige Bedingungen findet. Man wird daher schließen müssen, daß eine Störung der normalen Spaltverhältnisse des Zuckers im Blute seine Nichtverbrennbarkeit veranlaßt.[1]) Da die rein chemischen Faktoren, wie die Alkalescenz des Blutes, keine Handhabe zur Differenzierung dieses Spalt- oder Dissoziationsvermögens bieten, kann man zunächst die heuristisch jedenfalls brauchbare Hypothese machen, daß Enzyme

---

[1]) Ähnliche Anschauungen über diesen Punkt äußerte u. a. E. Abderhalden, Lehrb. d. physiol. Chem. 1906, S. 102 und H. Schade, Die Bedeutung der Katalyse für die Medizin, Kiel 1907, S. 126.

hier an den Hemmungs- oder Beschleunigungserscheinungen beteiligt sind.

Die, wenn auch nur in minimalem Umfange, so doch stets und sicher auftretende Spaltung des Zuckers in einer Richtung, welche als direkte Umkehrung der Assimilationssynthese bezeichnet werden muß, erklärt bei der synthetischen Verwendung der Spaltprodukte das Auftreten der verschiedenen Kohlenhydrate bzw. ihre Umwandlung ineinander, wie sie schon von Lobry du Bruyn und van Eckenstein beobachtet worden ist. Diese synthetische Verwendung kann immer eintreten, wenn eine Störung des unter den obwaltenden Verhältnissen möglichen Gleichgewichtes:

$$C_6H_{12}O_6 \rightleftarrows C_5H_{10}O_5 + CH_2O$$

eintritt, und die Bedingungen zur Synthese durch die Beschaffenheit des Mediums gegeben sind.

Innerhalb des lebenden Organismus wie im künstlichen Versuch lassen sich solche Verhältnisse chemisch und physikalisch schaffen. Chemisch durch Stoffe, welche den Traubenzucker schneller verändern als seine Spaltprodukte, und gleichzeitig die Geschwindigkeit der Reaktion:

$$xCH_2O = C_xH_{2x}O_x$$

auf einen höheren Wert halten als die Reaktionen:

$$CH_2O + C_5H_{10}O_5 = C_6H_{12}O_6$$

und

$$CH_2O \text{ (Zwischenphase)} = CH_2O \text{ (Formaldehyd)}.$$

Derartige Reaktionen, die sich nicht nur auf die CH_2O-Reste, sondern ebenso auf $C_2H_4O_2$-, $C_3H_6O_3$-Reste usw. beziehen können, sind z. B. bei der Elektrolyse des Glycerins und Glykols in saurer Lösung und bei den Umwandlungserscheinungen in verdünnten alkalischen Flüssigkeiten gegeben.

Physikalische Verhältnisse können z. B. dann entscheidend eingreifen, wenn die Zuckerlösung eine für die unzersetzten Moleküle undurchlässige, für die Spaltprodukte aber durchlässige Membran umspült. Die merkwürdige, von Michaelis und Rona[1]) sichergestellte Tatsache, daß der Zuckergehalt innerhalb der roten Blutkörperchen mit dem des Serums schwankt, obgleich der Zucker nicht in die Blutkörperchen einzutreten

[1]) Diese Zeitschr. 18, 514, 1909.

vermag, findet so eine ungezwungene Erklärung. Die Diffusionsgeschwindigkeit der Spaltreste CH_2O oder $C_2H_4O_2$ usw. in die Blutkörperchen kann genügend groß sein, um den Gehalt an diesen Resten in den Blutkörperchen in Abhängigkeit von der äußeren Zuckerkonzentration und dem durch sie bedingten Gleichgewicht zu halten. Es ist klar, daß im Innern der Blutkörperchen die Reste, welche durch die mechanische Trennung von den Traubenzuckermolekülen aus dem Gleichgewicht ausscheiden, den äußerst günstigen synthetischen Bedingungen unterliegen und innerhalb der Blutkörperchen den Zucker aufs neue synthetisch aufbauen. Daß hierbei wieder Traubenzucker — vorwiegend — entsteht, ist ohne weiteres verständlich, da die gleichen asymmetrischen Verhältnisse innerhalb wie außerhalb der Blutkörperchen den Aufbau beeinflussen werden. Diese Auffassung ist vorläufig eine Hypothese, die aber der experimentellen Prüfung zugänglich ist. Physikalisch-chemische Versuche zu ihrer Stütze sind im Gange; ich hoffe bald über dieselben berichten zu können.

Zusammenfassend möchte ich meine Auffassung, die sich aus den erwähnten Versuchen und bereits früher veröffentlichten ergeben hat, dahin präzisieren, daß der Zucker eine Art[1]) Dissoziation erleidet, welche einerseits den Abbau durch Oxydationen einleitet, andererseits Gelegenheit zu neuen Synthesen der Spaltprodukte in verschiedenen Richtungen gibt. Diese Dissoziation und die ihr folgende Synthese veranlassen die Umwandlung der Zuckerarten, das Auftreten der verschiedenen Zucker in der Natur und die Bildung einer Reihe von Reaktionsprodukten der anaeroben Atmung oder intramolekularen Oxydation, wozu ein Teil der Gärungserscheinungen zu rechnen ist.

[1]) Über die Art der Dissoziation werden in der demnächst erscheinenden ausführlichen Mitteilung nähere Angaben gemacht werden.

Notiz über die Anwendung des Wasserstoffsuperoxyds bei Oxydasenversuchen.

Von

T. Kikkoji und C. Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Bei zahlreichen Untersuchungen über die Wirkungsweise von „Tyrosinasen" ist von verschiedenen Seiten ein Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd bzw. von Wasserstoffsuperoxyd + Ferrosulfat angewendet worden. Wir haben nun beobachtet, daß Hydroperoxyd bei Gegenwart von Eisensalzen auf eine große Reihe solcher aromatischer Verbindungen einwirkt, die gerade zu den Oxydasenversuchen dienen. Es tritt dabei Dunkelfärbung, öfter — namentlich bei höherem Eisengehalt — auch Bildung brauner oder schwarzer Niederschläge ein.

Die Zusammensetzung derselben, über die weitere Untersuchungen im Gange sind, zeigt, daß sie mit den „Melaninen" nicht identisch sind. Da aber z. Z. die meisten Tyrosinasenversuche ohne chemische Kontrolle der entstandenen dunkelen Farbstoffe ausgeführt werden, liegt die Möglichkeit der Verwechselung mit echten enzymatischen Prozessen sowie einer Superposition der chemischen und der fermentativen Reaktion vor. Da überdies viele Enzymlösungen einen natürlichen Eisengehalt besitzen, so ist jedenfalls Vorsicht geboten bei der Anwendung des Wasserstoffsuperoxydes bei Oxydasenwirkungen, über welche die Anschauungen nach den neueren Untersuchungen von H. Euler und J. Bolin[1]) überhaupt eine Änderung erfahren werden.

Wir geben im folgenden eine vorläufige kurze Übersicht über die qualitativen Verhältnisse. Dazu bemerken wir, daß

---

[1]) H. Euler und J. Bolin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 80, 1908.

es meist gleichgültig ist, ob Ferro- oder Ferrisalz zur Anwendung kommt. Vielfach empfiehlt es sich, erst einige Tropfen der verdünnten Eisensalzlösung, dann Hydroperoxyd (3%ige Lösung) hinzuzugeben; gelindes Erwärmen (auf 40°) ist häufig förderlich; ein Überschuß von Wasserstoffsuperoxyd wirkt meistens wieder entfärbend. Der Dunkelfärbung gehen häufig grünliche und rotviolette Farbentöne vorauf.

1. Phenol: Unter anfänglicher Blaugrünfärbung schwarzer Niederschlag.
2. Hydrochinon:
3. Resorcin:
4. Phloroglucin:
5. Orcin:
6. β-Naphthol:
7. Pyrrol (verd. wäss. Aufschwemmung):

(2.–7.) Dicke schwarze Niederschläge.

8. Indol (wässerige Lösung): Dunkelfärbung.
9. Skatol „ „ : Färbt sich nur gelbbraun.
10. α-Methylindol (wässerige Lösung): Färbt sich nur gelbbraun.
11. Pyridin:
12. α- und β-Pikolin:
13. Chinolin:
14. Isochinolin:

(11.–14.) (Als Salze angewendet.) Anfangs grün oder blauviolett, dann dunkelbraun.

15. Thiophen (wässerige Aufschwemmung): Dunkelbraune Flocken.
16. Benzoesäure: Schwarzer Niederschlag.
17. Mandelsäure: „ „ (daneben Geruch nach Benzaldehyd).
18. Phenylglykokoll: Schwarzer Niederschlag (daneben Geruch nach Benzaldehyd).
19. Phenylalanin: Schwarzer Niederschlag (daneben Geruch nach Phenylacetaldehyd).
20. Tyrosin: Grün-, dann Schwarzfärbung.
21. Seidenfibroinpepton: Dunkelfärbung.
22. Hippursäure: Dunkler Niederschlag.
23. Adrenalin (freie Base): Erst Bräunung, dann dunkler Niederschlag.
24. Pyrrolidincarbonsäure: Gibt keine Färbung.

25. Histidin (Dichlorid wie freie Base): Wird über rotviolett dunkelbraun.

26. Tryptophan: Dunkle Niederschläge.

Größere Mengen wurden von der schwarzen Substanz aus Phenol auf folgendem Wege erhalten:

5,0 g Phenol wurden zusammen mit 2,0 g Ferrosulfat in Wasser gelöst und mit 150 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 3 % versetzt. Der bald ausfallende schwarze Niederschlag wurde nach 24 Stunden, wo das Hydroperoxyd verbraucht war, abgesaugt und gründlich mit Wasser ausgewaschen. Die getrocknete Substanz stellte eine bräunlich-schwarze Masse dar. Sie ist unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther u. dgl., wenig löslich in verdünnten Mineralsäuren, am ehesten in verdünnter Salpetersäure. In Alkalien ist sie leicht löslich und durch verdünnte Säuren wieder fällbar; aus den alkalischen Lösungen wird sie auch durch Schwermetallsalze (Bleiacetat, Kupfersulfat usw.) niedergeschlagen. Kochen mit Hydroperoxyd bewirkt wieder klare Auflösung unter Entfärbung. Während also die Substanz in vielen Beziehungen den „Melaninen" ähnelt, unterscheidet sie sich von ihnen scharf durch ihren Eisengehalt, der zu 12,60 % bis 14,32 % gefunden worden ist.

Die Untersuchung wird fortgesetzt.

Über eine Beziehung des Pyridins zu den Zuckerarten.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Daß in der Natur Übergänge von den Kohlenhydraten zu cyclischen Substanzen und von diesen zu den Zuckerarten stattfinden, wird vielfach, namentlich von den Pflanzenphysiologen angenommen.[1]) Chemische Tatsachen, die in diesem Sinne verwertet werden können, sind jedoch nur spärlich bekannt. Bei zahlreichen Versuchen, die ich nach dieser Richtung unternommen habe, bin ich bisher zu nur wenig befriedigenden Resultaten gelangt. Über die Bildung von Furfurol aus dem cyclischen Inosit bei trockener Destillation habe ich früher berichtet.[2]) Im folgenden sei die Überführung eines wichtigen Ringsystems, des Pyridins, in kohlenhydratähnliche Körper bzw. in Furfurol beschrieben. Auch dieser Übergang hat sich bisher keineswegs mit befriedigenden Ausbeuten bewerkstelligen lassen, aber der beschrittene, an sich recht einfache Weg scheint aussichtsvoll zu sein.

Folgende Überlegung lag den angestellten Versuchen ursprünglich zugrunde: Die Kohlenstoffkette der in der Natur weit verbreiteten Pentosen findet sich im Pyridin [I] wieder. Das wird namentlich deutlich, wenn man das Pyridin als inneres Anhydrid des 1-Oxy 5-imino-pentadiens-(1,3) [II] auffaßt. Letzteres ist ein Aldehydimin, die Imidoverbindung eines ungesättigten Aldehydalkohols [III], der durch Hydratation in 1,2 Dioxy-pentenal (β-Dioxyäthyl-acrolein) [IV] übergehen kann. Letzteres müßte durch eine geeignete Oxydation eine Pentose [V] ergeben.

---

[1]) Siehe hierüber bei W. Palladin, Über das Wesen der Pflanzennahrung. Diese Zeitschr. 18, 151, 1909.

[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 9, 551, 1908.

```
         CH                  CH
     HC╱    ╲CH          HC╱    ╲CH
I.    |      ||      II.  |      ||           =
     HC      CH          HC      CH·OH
       ╲   ╱               ╲
         N                   NH
```

$$\mathrm{HN:HC-CH=CH-CH=CH.OH.}$$

III. $\mathrm{OHC-CH=CH-CH=CH.OH.}$

IV. $\mathrm{OHC-CH=CH-CH.OH-CH_2.OH.}$

V. $\mathrm{OHC-CH.OH-CH.OH-CH.OH-CH_2.OH.}$

Die Reaktionsfolge läuft also auf eine 4fache Hydroxylierung des Pyridins unter Aufhebung der doppelten Bindungen hinaus. Nimmt man zunächst auf die etwaige Hydrolyse des Aldehydimins keine Rücksicht, so sieht man, daß außer der Hydratation die Zufuhr eines Atoms Sauerstoff nötig wäre.

Für diesen Zweck schien die Oxydation mit Hydroperoxyd und Eisensalz geeignet, weil hierbei erfahrungsgemäß Aldehydgruppen intakt bleiben können.

Da Pyridin als Base das anzuwendende Eisensalz ausfällt und damit unwirksam macht, ergab sich von selbst die Anordnung des Oxydationsversuches in saurer Lösung.

80,0 g reines Pyridin (1 Mol.) werden mit 80 ccm Wasser und mit einer abgekühlten Mischung von 50 g konz. Schwefelsäure (1 Mol.) und 50 ccm Wasser versetzt; darin löst man 10,0 g Ferrosulfat auf und gibt dann 2300 ccm 3 $^0/_0$iges Wasserstoffsuperoxyd hinzu. Die Flüssigkeit erwärmt sich nach einiger Zeit von selbst; nach 24 Stunden ist das Hydroperoxyd verbraucht. Die Lösung reduziert Fehlingsche Mischung schon in der Kälte und gibt eine namentlich nach einigem Stehen deutliche Naphthoresorcinprobe. Wenige Tropfen zeigen eine höchst intensive, prächtig kirschrote Phloroglucinreaktion nach Tollens; auch die Tollenssche Orcinprobe ist sehr stark, und zwar tritt sie in der etwas atypischen Weise ein, wie es bei Gegenwart von Eisensalzen der Fall ist.

Erhitzt man einige Kubikzentimeter mit der gleichen Menge 50 $^0/_0$iger H_2SO_4 zum Sieden, so kann man den entweichenden Furfuroldampf mit Anilinacetatpapier leicht nachweisen.

Niemand, der einer solchen Substanz begegnet, würde im Zweifel sein, daß sie zu den Pentosen gehört; trotzdem ist es bisher nicht möglich gewesen, eine solche zu isolieren.

Mit Phenylhydrazin- sowie p-Nitrophenylhydrazin-Acetat erhält man, und zwar recht schnell, Osazone, aber sie sind

unzweifelhaft Gemische, deren Aufteilung noch nicht gelungen ist.

Auch die Überführung in Furfurol verläuft nicht glatt; z. T. trägt hieran die Gegenwart von Eisensalz die Schuld, das den normalen Verlauf der Furfuroldestillation beeinträchtigt.

Bei der nach Tollens ausgeführten Verarbeitung auf Furfurol-phloroglucid steht die isolierte Menge desselben in offensichtlichem Mißverhältnis zu dem intensiven Ausfall der Farbenreaktionen. Es ist nicht unmöglich, daß in dem Reaktionsprodukte keine eigentlichen Pentosen, sondern Aminoderivate[1]) pentosenähnlicher Körper, bzw. Osone oder Carbonylsäuren vorliegen und das anomale Verhalten bedingen.

Überdies ist die Oxydation des Pyridins nicht vollständig; denn aus dem alkalisch gemachten Reaktionsprodukte können große Mengen der Base durch Destillation zurückgewonnen werden. Andererseits steigt die Ausbeute an furfurolliefernder Substanz auch bei einem großen Überschuß an Hydroperoxyd nicht. Der Ersatz des Ferrosulfates durch andere Katalysatoren ändert hieran ebenfalls nichts. An Stelle des Ferrosulfates kann Ferrisulfat mit dem gleichen Endresultate verwendet werden. Bei Gegenwart von Ferrisulfat färbt sich die Lösung des schwefelsauren Pyridins nach Zugabe des Wasserstoffsuperoxyds erst hellgelb, dann blaugrün; später wird sie violettstichig wie Chromsulfat und schließlich braun. Die Reaktionen des Oxydationsproduktes sind die gleichen wie bei der mit Eisenoxydulsalz erhaltenen Flüssigkeit.

Die Möglichkeit, daß eine Verunreinigung des Pyridins zur Entstehung der Farbenreaktionen und des Furfurols Anlaß geben könnte, ist gänzlich ausgeschlossen. Denn einerseits

---

[1]) Es ist natürlich möglich, daß sich die Ringöffnung des Pyridins auch in anderer Weise, etwa folgendermaßen, vollzieht:

Pyridin (Ring: CH; HC, CH; HC, CH; N) $\xrightarrow{H_2O_2}$ Ring: CH.OH; HO.HC, CH; HC, CH; N $\xrightarrow{H_2O}$ CH.OH; HO.HC, CH; OHC, CH; H_2N

$\xrightarrow{H_2O}$ OHC — CH.OH — CH.OH — CH.OH — $CH_2.NH_2$.

Eine solche amidierte Pentose würde natürlich nur sekundär Furfurol liefern können.

fallen vor der Behandlung mit Hydroperoxyd und Eisensalz alle diese Proben völlig negativ aus; andererseits erfährt auch reinstes Pyridin (Pyridin Kahlbaum und solches aus dem Zinksalz, ferner solches, das nochmals über das Quecksilberdoppelsalz gereinigt worden war) genau die gleiche Umwandlung.

Um nun die Ergebnisse überhaupt durch die Darstellung eines krystallisierten Derivates zu sichern, wurde trotz der schlechten Ausbeuten die Überführung in Furfurol vorgenommen.

Zu diesem Zwecke wurden nach und nach 1,2 kg Pyridin verarbeitet. Mehr als 80 g auf einmal anzusetzen, empfiehlt sich nicht, da die Selbsterwärmung sich sonst trotz äußerer Kühlung zu heftigem, lang anhaltendem Sieden mit stürmischer Gasentwicklung steigert und teilweise Verkohlung verursacht.

Das Reaktionsprodukt wurde dann in Portionen zu etwa 2 l mit dem halben Volumen 50%iger Schwefelsäure destilliert, bis ungefähr 1/2 l übergegangen war. Das Furfurol findet sich in diesem Anteile. Er stellt eine wie Zuckerdestillate riechende Flüssigkeit dar, die intensiv ammoniakalisch-alkalische Silberlösung, aber nicht die Fehlingsche Mischung reduziert.

Zur Abscheidung des Furfurols diente das p-Nitrophenylhydrazin. Bei der Darstellung des Hydrazons in bekannter Weise trat in der Kälte eine Trübung ein, die sich nach einiger Zeit beim gelinden Erwärmen auf dem Wasserbade zu scharlachroten Flocken verdichtete. Letztere bestanden aber nur zum kleinsten Teile aus dem Furfurolhydrazon, hauptsächlich aus einem sehr viel schwerer löslichen Körper. Sie wurden abgesaugt, im Exsiccator getrocknet, fein gepulvert und dann mit der 20fachen Menge siedenden Alkohols ausgekocht. Der beim Erkalten aus dem Filtrate sich abscheidende, allem Anscheine nach amorphe Niederschlag wurde verworfen, erst nach dem Abdampfen des Alkohols entstand ein braunroter Krystallbrei, der nach dem Umkrystallisieren aus verdünntem 30%igem Alkohol unter Zusatz von ein wenig Knochenkohle rein erhalten wurde. Es bildete scharlachrote Nädelchen, die (nach dem Sintern bei 126°) unter Gasentwicklung bei 153 bis 155° schmolzen. Die Ausbeute aus 64,6 g Rohnitrophenylhydrazinverbindung betrug nur 1,33 g.

0,1065 g Sbst.: 0,2246 g CO_2, 0,0385 g H_2O.

0,1229 g Sbst.: 19,3 ccm N (19°, 754 mm).

$C_{11}H_9O_3N_3$. Ber. C = 57,14; H = 3,90; N = 18,18.
Gef. C = 57,51; H = 4,02; N = 17,87.

Die Verbindung ist mit dem bekannten Furfurol-p-nitrophenylhydrazon identisch.

Damit ist die Entstehung von Furfurol aus Pyridin nachgewiesen, und es soll die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein, den Mechanismus der Reaktion zu klären und namentlich die Ausbeuten zu erhöhen.

Übrigens können auch α- und β-Picolin, Lutidin, Chinolin, Isochinolin, Indol und Pyrrol durch Hydroperoxyd und Eisensalze in stark reduzierende Substanzen übergeführt werden.[1]) Die gelegentlich dieser Versuche gleichfalls beobachtete Bildung von Glycerose aus Allylalkohol

$$CH_2 = CH - CH_2OH \longrightarrow CHO - CHOH - CH_2OH$$
$$\text{bzw. } CH_2OH - CO - CH_2OH.$$

durch dasselbe Oxydationsgemisch zeigt, daß Wasserstoffsuperoxyd an doppelten Kohlenstoffbindungen tatsächlich Hydroxylierung ohne Kettenverkürzung bewirken kann.

[1]) Vgl. hierzu T. Kikkoji und C. Neuberg, diese Zeitschr. 20, 523, 1909.

Abbau einiger Di- und Oxy-aminosäuren.

Von

Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Die Reaktion mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalzen, die in der Kohlenhydratreihe Fenton, Morrell und Crofts, Ruff und anderen so wichtige Ergebnisse geliefert hat, ist vor längerer Zeit von mir und F. Blumenthal auf Aminosäuren und Eiweißkörper angewendet worden.[1]) Des gleichen Oxydationsverfahrens haben sich zu ähnlichen Zwecken dann A. Orgler[2]) und in besonders ausführlicher Weise H. D. Dakin[3]) bedient. Es hat sich hierbei gezeigt, daß die gewöhnlichen Monoaminosäuren bei der Reaktion unter Abspaltung von Ammoniak und Ameisensäure, die größtenteils zu Kohlendioxyd oxydiert wird, in die um ein Kohlenstoffatom ärmeren Aldehyde übergehen; z. B. Leucin in Isovaleraldehyd.

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} \!\!> CH - CH_2 - CH . NH_2 - COOH \longrightarrow CO_2 + NH_3 + \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} \!\!> CH - CH_2 - CHO$$

Eine solche Aldehydspaltung der Aminosäuren vollzieht sich nun auch bei den katalytischen Einwirkungen des Sonnenlichtes[4]) auf Eiweißspaltungsprodukte und unter dem Einflusse des elektrischen Stromes.[5]) Die Umwandlung durch

[1]) C. Neuberg und F. Blumenthal, Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 1; Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 238, 1902.

[2]) A. Orgler, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 583, 1902.

[3]) H. D. Dakin, Journ. of Biol. Chem. 1, 171, 1906 u. 4, 63, 1908.

[4]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 305, 1908.

[5]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 17, 270, 1909.

Strahlenarten erfahren nicht allein die Monoaminosäuren, sondern auch Di- und Oxy-aminosäuren; dabei entstehen, wie teils bereits mitgeteilt,[1]) teils noch unveröffentlicht ist, Amino- bzw. Oxy-aldehyde. Schon früher habe ich hervorgehoben, daß zwischen diesen Wirkungen von Strahlenarten und der Reaktion mit Hydroperoxyd + Eisensalzen eine gewisse Ähnlichkeit besteht; es lag demnach nahe, das Verhalten von Oxyamino- und Diamino-Säuren bei der einfachen Wasserstoffsuperoxydreaktion zu untersuchen.

a) Abbau von Isoserin.

1. 5,25 g Isoserin wurden in 200 ccm Wasser gelöst, mit 60 ccm Hydroperoxydlösung von 3⁰/₀ und 2,0 g Ferrosulfat versetzt. Die Flüssigkeit erwärmte sich beim Stehen von selbst, nach 24 Stunden war alles Wasserstoffsuperoxyd verbraucht. Die Lösung reduzierte Fehlingsche Mischung schon in der Kälte. Bei längerem, gelindem Erwärmen mit essigsaurem Phenylhydrazin gab sie reichlich Glyoxalphenylosazon vom Schmelzpunkt 175,5°.

Zur Abscheidung der reduzierenden Substanz diente das p-Nitrophenylosazon, das sich aus dem zu erwartenden Aminoacetaldehyd nach früheren Erfahrungen[2]) nahezu quantitativ bildet.

Dasselbe wurde in bekannter Weise dargestellt und gereinigt.[3]) Es wurden 2,16 g reines p-Nitrophenylosazon vom Schmelzpunkt 309 bis 310° erhalten.

$C_{14}H_{12}O_4N_6$. Ber. C = 51,22; H = 3,67; N = 25,61.
Gef. C = 51,54; H = 3,30; N = 25,47.

Die Isolierung der Osazone gestattet kein Urteil darüber, ob die Reaktion tatsächlich im Sinne des folgenden Schemas unter Bildung von Aminoacetaldehyd verlaufen ist:

$$CH_2 . NH_2 - CH . OH - COOH \rightarrow CH_2 . NH_2 - CHO;$$

denn dieselben Osazone würden auch aus dem durch Desamidierung entstandenen Glykolaldehyd, $CH_2 . OH - CHO$, hervorgehen.

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 17, 270, 1909.

[2]) C. Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 956, 1908; diese Zeitschr. 20, 450, 1909.

[3]) A. Wohl und C. Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 33, 3107, 1900.

Zur Entscheidung diente der Oxydationsversuch mit Natronlauge und Sublimat, bei dem der Aminoacetaldehyd eine flüchtige Base, das leicht nachweisbare Pyrazin, liefert, während der stickstofffreie Glykolaldehyd dazu natürlich nicht befähigt ist.

2. Zu diesem Zwecke wurden nochmals 5,25 g Isoserin in der angegebenen Weise mit Hydroperoxyd und Ferrosulfat oxydiert, mit starker Natronlauge alkalisch gemacht und sofort mit 15 g Quecksilberchlorid versetzt. Unter heftiger Reaktion, die zur Bildung von Kalomel und metallischem Quecksilber führte, erfolgte die Kondensation; durch Wasserdampf wurde das gebildete Pyrazin übergetrieben und aus dem mit Salzsäure neutralisierten und filtrierten Destillate mit gesättigter Quecksilberchloridlösung als die Doppelverbindung $C_4H_4N_2 . HgCl_2$ gefällt, die sich in den charakteristischen flimmernden Krystallen abschied. Erhalten wurden 1,38 g Pyrazin-quecksilberchlorid.

Durch nochmalige Destillation mit Natronlauge, Fällung mit Goldchlorid und Umkrystallisieren wurden daraus 0,3 g typisches Pyrazin-goldchlorid, $C_4H_4N_2 . AuCl_3$, vom Schmelzpunkt 200 bis 201° gewonnen.

$C_4H_4N_2 . AuCl_3$. Ber. $N = 7{,}33$; $Au = 51{,}30$.
Gef. $N = 7{,}08$; $Au = 51{,}42$.

Durch die Isolierung des Pyrazins, das aus Aminoacetaldehyd nach der Gleichung:

$$\begin{matrix} NH_2 - CH_2 - CHO \\ OHC - CH_2 - NH_2 \end{matrix} + O = 3H_2O + \begin{matrix} N = CH - CH \\ | \qquad\qquad \| \\ CH = CH - N \end{matrix}$$

entsteht, ist bewiesen, daß der Zerfall des Isoserins in der angegebenen Weise vor sich geht.

Umgekehrt kann man bekanntlich vom Aminoacetaldehyd auch zum Isoserin gelangen.[1])

3. Nach der Oxydation mit Hydroperoxyd zeigte das aminoaldehydhaltige Oxydationsgemisch aus Isoserin amphotere Reaktion. Da nun aber der Aminoacetaldehyd in neutraler Lösung wenig beständig ist, wurde die Oxydation bei Gegenwart von Salzsäure vorgenommen, d. h. HCl-Isoserin angewendet.

[1]) C. Neuberg und P. Mayer, diese Zeitschr. 3, 116, 1907.

5,25 g Isoserin wurden in 50,0 ccm n-Salzsäure und 200 ccm Wasser gelöst, dann mit 2,0 g Ferrosulfat und 60 ccm 3%igem Wasserstoffsuperoxyd versetzt.

Die weitere, den vorherigen Angaben entsprechende Verarbeitung der Flüssigkeit, die jetzt salzsauren Aminoaldehyd enthielt, ergab 2,55 g p-Nitrophenylosazon.

$C_{14}H_{12}O_4N_6$. Ber. N = 25,61%.
Gef. N = 26,03%.

4. 5,25 g Isoserin wurden bei Gegenwart von 50,0 ccm n-Salzsäure usw. mit Hydroperoxyd behandelt und dann mit Alkali und Sublimat in Pyrazin übergeführt. Die Menge des hierbei erhaltenen Pyrazin-quecksilberchlorids betrug 1,60 g.

Die Oxydation in salzsaurer Lösung hob demnach die Ausbeuten an Aminoacetaldehyd nur unwesentlich. Hier wie in allen folgenden Fällen war eine mehr oder minder deutlich positive Naphthoresorcinprobe erhältlich, die auf die Gegenwart von Carbonylsäuren[1]), etwa $CH_2 . NH_2 — CO — COOH$ oder $CH_2OH — CO — COOH$, zu beziehen ist.

b) Abbau von Serin.

5,25 g Serin wurden in 200 ccm Wasser gelöst und nach Zugabe von 2,0 g Ferrosulfat mit 60 ccm Hydroperoxyd von 3% versetzt.

Nach Ablauf von 24 Stunden war das Wasserstoffsuperoxyd verschwunden, und die Flüssigkeit reduzierte Fehlingsche Mischung stark schon in der Kälte; ferner zeigte sie eine positive Naphthoresorcinprobe. Das Volumen der Flüssigkeit war zuvor auf 300 ccm aufgefüllt. Die Loslösung von Ammoniak gab sich dadurch zu erkennen, daß im Gegensatz zu dem Reaktionsprodukte aus Isoserin ein großer Teil des angewandten Ferrosulfates als basisches Eisensalz ausgefallen war. Durch Destillation eines aliquoten Teiles (50,0 ccm) mit Magnesia ergab sich, daß rund 40% der theoretisch möglichen Menge Ammoniak abgespalten worden waren.

Aus den restierenden ca. 250 ccm wurden 2,2 g typisches Glykolaldehyd-p-nitrophenylosazon (F. 310°) erhalten.

---

[1]) J. A. Mandel und C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 148, 1908.

$C_{14}H_{12}O_4N_6$. Ber. C = 51,22; H = 3,66.
Gef. C = 50,93; H = 3,27.

Der oxydative Abbau des Serins

$$CH_2.OH - CH.NH_2 - COOH \xrightarrow[H_2O]{O} NH_3 + CO_2 + CH_2 \cdot OH - CHO$$

vollzieht sich also unter hydrolytischer Desamidierung und ergibt Glykolaldehyd, aus dem das Serin umgekehrt aufgebaut werden kann.[1])

c) Abbau von α, β-Diaminopropionsäure.

1. 4,7 g reines, von Isoserin freies α, β-Diaminopropionsäurebromhydrat wurden in 75 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von 1,0 g Ferrosulfat mit 30 ccm 3%igem Hydroperoxyd behandelt.

Die Reaktion verlief wie beim Serin und Isoserin; es entstand eine in der Kälte reduzierende Flüssigkeit, die eine schwach positive Naphthoresorcinprobe gab.

Mit Magnesia war Abspaltung von Ammoniak feststellbar, und die Behandlung mit p-Nitrophenylhydrazin in essigsaurer-alkoholischer Lösung usw. lieferte 1,02 g Glyoxal-p-nitrophenylosazon vom Schmelzpunkt 308 bis 309,5°.

$C_{14}H_{12}O_4N_6$. Ber. N = 25,61.
Gef. N = 25,95.

2. Bei analoger Oxydation von 4,7 g bromwasserstoffsaurer α, β-Diaminopropionsäure und nachheriger Behandlung mit Natronlauge und Sublimat resultierten 0,58 g Pyrazin-quecksilberchlorid.

Von den beiden Aminogruppen der α, β-Diaminopropionsäure, die in gewisser Hinsicht den Charakter des Serins und Isoserins in sich vereint, bleibt bei der Oxydation mit Hydroperoxyd die β-ständige wie beim Isoserin am Kohlenstoffrest gebunden, die α-ständige wird wie beim Serin als Ammoniak abgespalten; es entsteht also Aminoacetaldehyd:

$$CH_2.NH_2 - CH.NH_2 - COOH \xrightarrow[H_2O]{O} NH_3 + CO_2 + CH_2.NH_2 - CHO.$$

[1]) E. Fischer und H. Leuchs, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 3787, 1907.

d) Weitere entsprechende Abbauversuche

wurden mit d-Glucosaminsäure und der aromatisch-aliphatischen Oxy-aminosäure Tyrosin vorgenommen.

Erstere ergab unter Ammoniakabspaltung eine Pentosenlösung:

$$CH_2OH - (CH.OH)_3 - CH.NH_2 - COOH \longrightarrow$$
$$CH_2OH - (CH.OH)_3 - CHO.$$

Komplizierter war der Verlauf der Wasserstoffsuperoxydreaktion beim Tyrosin. Nach Analogie mit den übrigen Ergebnissen war der Übergang in p-Oxyphenylacetaldehyd zu erwarten:

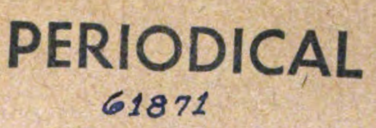
$$HO-C_6H_4-CH_2-CH.NH_2-COOH \longrightarrow HO-C_6H_4-CH_2-CHO$$

wie ihn jüngst K. Langheld[1]) durch Natriumhypochlorit bewerkstelligt hat. Der p-Oxyphenylacetaldehyd entsteht auch, er ist aber von anderen Produkten begleitet, die durch eine Kernhydroxylierung des Benzolringes gebildet sind. Ganz entsprechend verläuft auch die Wasserstoffsuperoxydoxydation der Mandelsäure ($C_6H_5 - CH.OH - COOH$) und des Phenylglykokolls ($C_6H_5 - CH.NH_2 - COOH$), indem neben Benzaldehyd Oxybenzaldehyde und Oxybenzoesäuren (nach der starken Eisenchloridreaktion zu urteilen, vielleicht Salicylsäure) auftreten. Hierüber, ferner über die Oxydation des Phenylalanins soll später genauer berichtet werden.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 2360, 1909.

Autorenverzeichnis.


PERIODICAL
61871





